

Université de Montréal

**Profil transcriptionnel de lymphocytes T CD4⁺ infectés par
le VIH-1 de manière latente chez des individus sous
trithérapie antirétrovirale**

par Plantin, Johann

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Microbiologie/Immunologie

Juin 2018

© Plantin Johann, 2018

Ce mémoire intitulé:

Profil transcriptionnel de lymphocytes T CD4⁺ infectés par le VIH-1 de manière latente chez
des individus sous trithérapie antirétrovirale

Présenté par:

Johann Plantin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Ali Ahmad, président rapporteur

Dre Caroline Gilbert, membre du jury

Dr Nicolas Chomont, directeur de recherche

Résumé

L'infection par le VIH reste un problème de santé publique majeur, non seulement car il n'existe pas de vaccin préventif, mais aussi, car le traitement par les antirétroviraux n'offre pas de solution curative définitive. Malgré les progrès considérables dans l'accessibilité et l'efficacité des traitements l'arrêt du traitement chez les individus possédant une charge virale indétectable conduit presque invariablement à un rebond viral. Le VIH établit une latence dans certains lymphocytes T CD4⁺, et plus particulièrement dans les sous-populations mémoires « centrales » « transitionnelles » et « effectrices » (TCM, TTM et TEM, respectivement). Lorsque la pression antirétrovirale est interrompue, ces cellules sont capables de produire de nouveaux virions infectieux qui seront la cause du rebond viral. Il est généralement admis que l'un des facteurs importants dans la maintenance de la latence du VIH est une inhibition de l'élongation, de la polyadénylation et de l'épissage des transcrits viraux. Dans ce travail, nous avons développé une technique de RT-PCR sensible et robuste couplée à l'utilisation de standards ARN. Cette technique permet la quantification absolue de différents transcrits du VIH-1 au sein de lymphocytes T CD4⁺ totaux ainsi que dans les différentes sous-populations mémoires afin d'établir leur profil transcriptionnel à l'état d'infection latente. Nous avons ainsi identifié un blocage potentiel dans la production de transcrits long, polyadénylés et polyépissés à l'état de latence. Dans le contexte curatif du « Shock and Kill », nous avons également évalué l'impact de différents agents pharmacologiques sur la réactivation de la transcription du VIH-1 en analysant le changement du profil transcriptionnel des lymphocytes T CD4⁺. Nous avons conclu que l'utilisation de différentes familles d'agents anti-latence était plus efficace dans l'induction de transcription en combinaison plutôt qu'utilisés seuls.

Mots-clés : VIH-1, Transcription, Latence, Réactivation, Profil transcriptionnel, Polyadénylation, Élongation, Poly-épissage, Agents anti-latence

Abstract

Infection with HIV remains a serious public health issue as there is currently no preventive vaccine available, and the current treatment does not offer definitive curative results. Although significant progress has been made in efficacy and accessibility of treatment, its interruption in HIV-infected individuals who have undetectable viral load almost invariably leads to viral rebound. HIV establishes latency in CD4⁺ T cells and primarily in “central”, “transitional” and “effector” memory CD4⁺ T cell subsets (TCM, TTM et TEM, respectively). When the antiretroviral pressure is interrupted, these cells will produce new infectious virions that will be the cause of this viral rebound. It is generally accepted that one of the important factors regulating HIV latency resides in the inhibition of elongation, polyadenylation, and multiple-splicing of viral transcripts. We report in this work the successful generation of a robust and sensitive RT-PCR technique coupled with the use of RNA standards. This technique enables the absolute quantification of different transcripts of HIV-1 in total and in memory subsets of T CD4⁺ lymphocytes to establish their transcriptional profile in latent HIV-1 infection. We have identified potential blocks in transcription of long, polyadenylated and multiply spliced transcripts. In the curative context of the “Shock and Kill” approach, this work has also measured the impact of different latency reversing agents on the reactivation of HIV-1 transcription by analysing the changes in the transcriptional profile of CD4⁺ T lymphocytes. We have concluded that the utilization of different families of latency reversing agents are more efficient in the induction of transcription when combined rather than when used alone.

Keywords : HIV-1, Transcription, Latency, Reactivation, Transcriptional profile, Completion, Elongation, Multiple-splicing, Latency reversing agents

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles.....	x
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Introduction au SIDA/VIH.....	1
1.2 L'infection par le VIH.....	4
1.3 Cycle viral.....	9
1.4 Les réservoirs latents.....	12
1.5 La latence et ses implications.....	18
1.6 Hypothèses.....	29
1.7 Objectifs.....	29
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	30
2.1 Participants à l'étude et considérations éthiques.....	30
2.2 Génération d'oligonucléotides/sondes et technique de RT-PCR nichée.....	31
2.3 Génération des standards ARN.....	34
2.3.1 Transformation bactérienne avec le plasmide d'intérêt, maxiprep, amplification et purification de l'ADN M13.....	34
2.3.2 Transcription <i>in vitro</i> , mesure de taille et de concentration des ARN nouvellement transcrits.....	35
2.4 Enrichissement et culture de lymphocytes T CD4 ⁺	35
2.5 Stimulation des lymphocytes T CD4 ⁺	36
2.6 Contrôle de pureté et d'activation.....	36
2.7 Extraction d'ARN.....	38
2.8 Stratégie de tri pour les sous-populations de lymphocytes T CD4 ⁺ mémoires.....	38

Chapitre 3 : Résultats	40
3.1 Mise au point des techniques de RT-PCR ultrasensibles.....	40
3.1.1 Élaboration et vérification des oligonucléotides.....	40
3.1.2 Génération des standards par transcription <i>in vitro</i>	42
3.1.3 Mise au point des standards ARN.....	43
3.1.4 Détermination de la sensibilité de la technique	44
3.2 Modulation du profil transcriptionnel de lymphocytes T CD4 ⁺ après activation par la PMA-ionomycine.....	45
3.2.1 Contrôle de pureté et d'activation des lymphocytes T CD4 ⁺	46
3.2.2 Profil au sein de lymphocytes non stimulés.....	46
3.2.3 Profil au sein de lymphocytes stimulés par PMA-ionomycine.....	50
3.2.4 Corrélation entre les niveaux de transcrits dans les lymphocytes T CD4 ⁺ stimulés/non-stimulés et les mesures: 1) d'ADN intégré; 2) de réservoirs compétents à la traduction; 3) de réservoirs infectieux	51
3.3 Impact de différents agents anti-latence sur l'induction transcriptionnelle au sein des lymphocytes T CD4 ⁺	56
3.3.1 Concentrations CE50 (concentration efficace médiane).....	56
3.3.2 Concentrations à effet maximal, et combinaisons	59
3.4 Quantification des transcrits au sein de sous-populations de lymphocytes T CD4 ⁺ mémoires.....	63
3.4.1 Stratégie de tri par cytométrie de flux.....	63
3.4.2 Quantification d'ADN et d'ARN dans les sous-populations de lymphocytes T CD4 ⁺ mémoires.....	63
3.4.3 Normalisation des mesures d'ARN par unité provirale dans les sous-populations de lymphocytes T CD4 ⁺ mémoires.....	66
3.4.4 Profil transcriptionnel au sein des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 ⁺ mémoires.....	68
Chapitre 4 : Discussion	71
4.1 Validation de la technique de RT-PCR et des standards ARN.....	71
4.2 Profil transcriptionnel du VIH au sein de lymphocytes T CD4 ⁺ au repos.....	73

4.3 Modulation du profil transcriptionnel du VIH au sein de lymphocytes T CD4 ⁺ après stimulation par la PMA et l'ionomycine.....	76
4.4 Corrélation des mesures d'ARN avec différentes techniques de mesure de réservoir du VIH	78
4.5 Modulation du profil transcriptionnel du VIH avec différents agents anti-latence	79
4.6 Profil transcriptionnel du VIH au sein de sous-population de lymphocytes T CD4 ⁺ mémoires.....	82
4.7 Perspectives et futures expériences.....	85
Chapitre 5 : Conclusion	87
Bibliographie.....	89

Liste des tableaux

Tableau 1. Résumé des propriétés des agents anti-latences utilisés.....	19
Tableau 2. Caractéristiques des individus infectés par le VIH sous thérapie antirétrovirale..	30
Tableau 3. Propriétés des oligonucléotides et sondes.....	33
Tableau 4. Valeurs des différentes mesures de corrélations entre les quantités d'ARN mesuré par millions de lymphocytes T CD4+ et différentes mesures de réservoirs.....	53

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique d'un virion du VIH.....	3
Figure 2. Schéma du court d'une infection classique par le VIH chez les individus non traité.....	5
Figure 3. Représentation schématique du concept de rebond viral lors de l'arrêt du traitement antirétroviral.....	7
Figure 4. Représentation schématique du cycle viral du VIH.....	9
Figure 5. Structure génétique du génome du VIH-1.....	11
Figure 6. Représentation schématique des différents destins d'une cellule T CD4+ mémoire infecté de manière latente.....	14
Figure 7. Représentation schématique de la différenciation des sous-populations de lymphocytes T CD4+ ainsi que de leur contribution relative au réservoir.....	15
Figure 8. Représentation schématique simplifiée du concept de "Shock and Kill".....	18
Figure 9. Régulation épigénétique et transactivation par NF-kappaB et Tat de la transcription du VIH.....	21
Figure 10. Schéma récapitulatif des mécanismes d'activation et d'inhibition de la transcription du VIH.....	23
Figure 11. Représentation schématique de la boucle Tar.....	25
Figure 12. Représentation schématique des différents transcrits du VIH.....	28
Figure 13. Contrôle de pureté et d'activation.....	37
Figure 14. Stratégie de tri des sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires par cytométrie de flux.....	39
Figure 15. Les oligonucléotides développés sont spécifiques au VIH et capables de détecter efficacement les ARN cibles chez les individus infectés par le VIH.....	41
Figure 16. Contrôle de qualité des transcrits générés in vitro.....	42
Figure 17. Courbes standards générées par transcription in vitro.....	43
Figure 18. La technique de RT-PCR est sensible pour chacun des transcrits mesurés.....	45

Figure 19. L'activation par la PMA-ionomycine augmente l'élongation, la maturation et le polyépissage des transcrits du VIH.....	49
Figure 20. La fréquence de cellules contenant de l'ADN du VIH intégré corrèle avec la quantité de transcrits Pol dans les lymphocytes T CD4+ non stimulés.....	54
Figure 21. La production de protéine P24 corrèle avec la quantité de transcrits Tat-Rev dans les lymphocytes T CD4+ stimulés.....	55
Figure 22. L'activation par l'ingénol induit une forte augmentation de transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-rev comparativement aux autres agents.....	58
Figure 23. Les combinaisons d'agents pharmacologiques hautement concentrés induisent une transcription d'ARN R maximale et une transcription d'ARN Pol, Poly-A et Tat-Rev sous-optimale.....	62
Figure 24. De plus grandes quantités d'ADN intégré et d'ARN R, Pol et Tat-rev sont mesurées dans les sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires.....	65
Figure 25. Les transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-rev sont produits en quantité similaire par unité provirale dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoire.....	67
Figure 26. Les profils transcriptionnels sont similaires dans les sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires.....	70

Liste des sigles

ADN : Acide désoxyribonucléique

AP-1: Activator protein 1

APOBEC: Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like

AAL: Agents anti-latence

ARN: Acide ribonucléique

ARV: Antiretroviraux

AZT: Azidothymidine

BRD4: Bromodomain containing protein 4

Bri: Inhibiteur de bromodomaine

Cat#: Numero de catalogue

CCR5: Chemokine receptor type 5

CCR7: Chemokine receptor type 7

CD: Cluster of differentiation

CDC: Center for disease control and prevention

CDK9: Cyclin-dependent kinase 9

CE50: Concentration efficace médiane

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CXCR4: Chemokine receptor type 4

DMSO: Dimethyl sulfoxide

ELDA: Extreme limiting dilution assay

FA: Formaldéhyde

FBS: Fetal Bovine Serum

Gag: Group-specific antigen

gp120: Glycoprotéine 120

gp41: Glycoprotéine 41

GRID: Gay related immune deficiency

HDAC: Histone déacétylase

HDACi: Histone déacétylase inhibiteur

HEXIM1: Hexamethylene bisacetamide inducible 1

HLA-DR: Human Leukocyte Antigen – antigen D Related

HTLV-III: Human T lymphotropic virus

IgM: Immunoglobuline de type M

LAV: Lymphadenopathy associated virus

LTR: Long terminal repeat

Nef: Negative regulatory factor

NF- κ B: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells

NUC-1: Nucléosome-1

P-TEFb: Positive transcription elongation factor

PBMC: Peripheral blood monocytes

PCR: Polymerase chain reaction

PKC: Protéine Kinase C

PMA: Phorbol myristate acetate

Q-VOA: Quantitative viral growth assay

RasGRP: RAS guanyl nucleotide-releasing protein

Rev: Regulator of expression of virion proteins

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

RRE: Rev response element

RT: Reverse transcription

SAMHD1: SAM domain and HD domain-containing protein 1

SIDA: Syndrome d'immunodéficience acquise

SNF: Sucrose Non-Fermentable

SP1: Specificity protein-1

SW1: SwItch

TAR: Trans-activation response element

Tat: Transactivator protein

TCM: T centrale mémoire

TCR: T cell receptor

TEM: T effectrice mémoire

TILDA: Tat-Rev induced limiting dilution assay

TN: T naïve

TTM: T transitionnelle mémoire

Vif: Viral infectivity factor

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

Vpr: Viral protein R

Vpu: Viral Protein U

Liste des abréviations

Bryo. : Bryostatine

h. : Heure

Ing. : Ingénol

Io. : Ionomycine

min. : Minute

Pano. : Panobinostat

Romi. : Romidepsine

Sec. : Seconde

Remerciements

Ce travail et cette expérience de recherche ont été rendus possibles grâce à l'esprit d'équipe, la solidarité, ainsi que l'organisation de notre équipe de laboratoire. Je ne serai pas allé très loin sans leur soutien et leur bonne humeur quotidienne. Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de recherche, Dr. Nicolas Chomont, qui a cru en moi malgré les épreuves scientifiques que nous avons dû surmonter. Je souhaite par-dessus tout souligner l'importance et la chance d'avoir un directeur de recherche modeste, à l'écoute, et qui sais assumer le rôle de chef de groupe, mais aussi de mentor qui prône la créativité et l'initiative scientifique. Merci pour cette expérience que je n'oublierai pas.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Introduction au SIDA/VIH

En 1981, aux États-Unis, plusieurs cas de personnes souffrantes de symptômes de *Pneumocystis carinii*, une infection opportuniste rare, ainsi que des personnes atteintes du Sarcome de Kaposi, un cancer de la peau rare, ont été rapportés (Centers for Disease 1982b). Deux paramètres sociaux étaient similaires chez les individus concernés initialement; l'orientation homosexuelle (majoritairement hommes) et/ou l'utilisation de drogues à injections intraveineuses (Gilman 1987). Dans un court laps de temps, les taux de morbidités pour *Pneumocystis carinii* et le Sarcome de Kaposi ont augmenté considérablement (Friedman-Kien 1981), poussant le CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) à investir dans le contrôle de l'épidémie. Initialement, plusieurs dénominations discriminatoires ont été attribuées à cette maladie par la presse générale, comme « GRID » (*gay-related immune deficiency*), ou la « 4H disease », qui représentait quatre communautés distinctes qui semblaient être particulièrement touchées par cette maladie; les homosexuels, les utilisateurs d'héroïne, les hémophiles ainsi que les haïtiens. Le CDC utilisait initialement la dénomination lymphadénopathie (Centers for Disease 1982a), décrivant plutôt la maladie dont l'étiologie demeurait inconnue. Étant donné que les infections opportunistes par *Pneumocystis carinii* étaient associées à un système immunitaire très affaibli, et qu'après analyses plus détaillées, la maladie n'était pas restreinte aux communautés mentionnées par les dénominations générales de la presse, le CDC a décidé en septembre 1982 que la dénomination SIDA pour Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquisée serait adoptée (AIDS pour *Acquired ImmunoDeficiency*

Syndrome en anglais) (Centers for Disease 1982b). Bien que la pathologie ait été nommée, l'agent causal resta non identifié jusqu'en 1983 où deux groupes de chercheurs; 1) Robert Gallo et 2) Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier, ont simultanément déclaré avoir découvert un nouveau virus provenant d'un individu atteint du SIDA. Tous deux ont publié dans le même journal, nommant leur nouveau virus HTLV-III (*Human T-lymphotropic virus*) et LAV (*Lymphadenopathy-associated virus*) respectivement (Barre-Sinoussi et al. 1983) (Gallo et al. 1983). Les deux virus identifiés se sont révélés être les mêmes et ont été renommés VIH pour virus d'immunodéficience humaine (HIV en anglais). Depuis, les connaissances sur la nature du VIH ont évolué exponentiellement, et malgré les dégâts qu'il a causés et continue de causer à travers le globe, les connaissances dans des domaines fondamentaux comme l'immunologie et la virologie en ont bénéficié grandement.

Le VIH est présentement classé en deux types, soit le VIH-1 et VIH-2, qui proviennent phylogénétiquement du virus de l'immunodéficience simienne provenant de chimpanzés et du singe vert mangabey respectivement. La souche VIH-1 est connue pour être virulente et est l'agent causal principal du SIDA. La souche VIH-2, principalement retrouvée en Afrique de l'Ouest, est moins virulente et infectieuse (Sharp and Hahn 2010). D'une taille d'environ 100nm et de forme sphérique, le VIH-1 est un lentivirus possédant une bicouche lipidique et faisant partie de la famille des rétrovirus. Le VIH-1 est sous-divisé en plusieurs groupes dont le groupe M qui est connu pour être responsable de la pandémie actuelle. Ce groupe M possède aussi plusieurs sous-types, soulignant ainsi la grande diversité et la capacité rapide d'évolution de ce virus (Sharp and Hahn 2010). Sur sa surface externe, on retrouve des protéines de l'enveloppe composées de trimère de glycoprotéine 120 (gp120) ancrées dans la

bicouche lipidique par un trimère de la glycoprotéine 41 (Figure 1). La surface interne du virion est entourée de la protéine de matrice et englobe la capside virale conique formée par la protéine interne de capside et de la protéine de nucléocapside. À l'intérieur de celle-ci réside le génome viral, soit deux ARN simple brin identiques d'environ 9200-9600 paires de bases, ainsi que des protéines importantes pour le cycle d'infection virale (Seitz 2016). Plus de 30

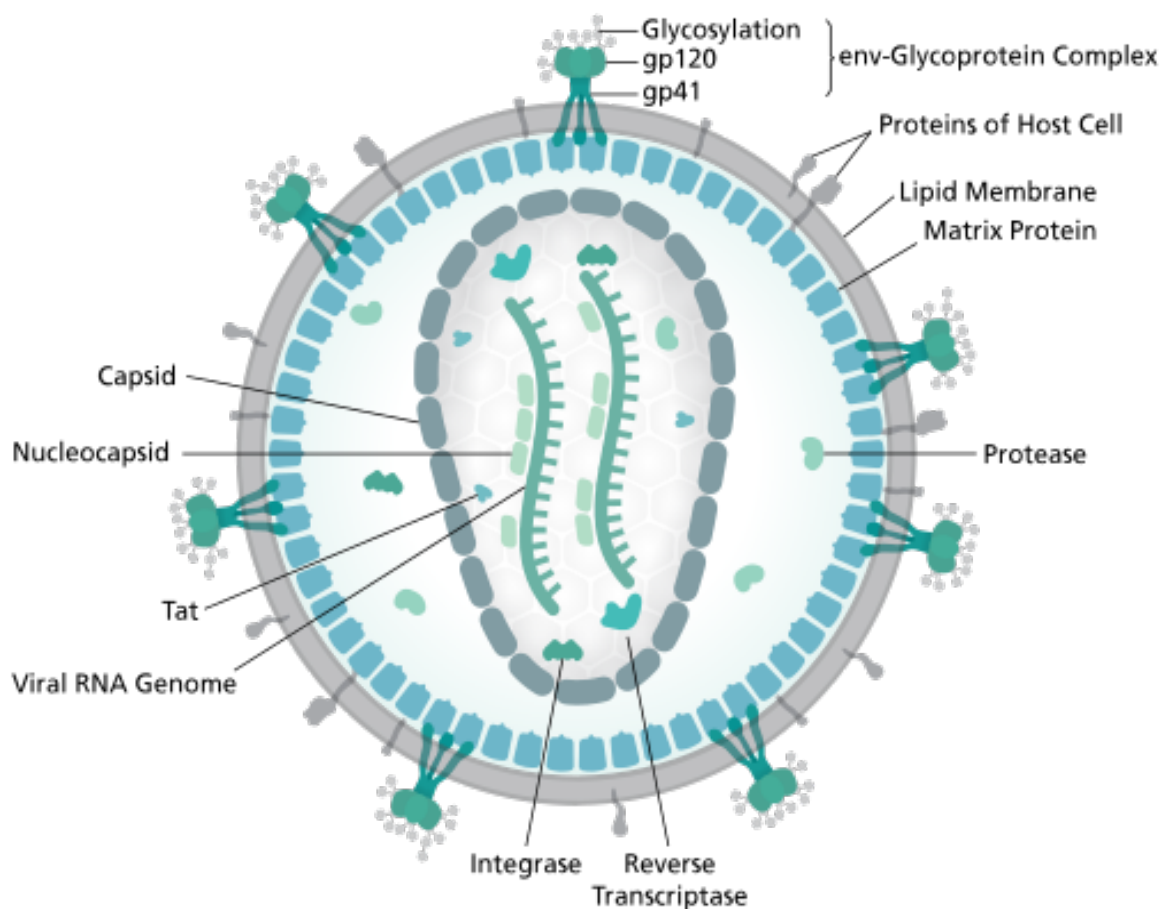


Figure 1. Représentation schématique d'un virion du VIH. Provenant de "Structure and genome of HIV" dans *Wikipedia, l'encyclopédie gratuite*, URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/HIV>, date de visite: 18 Juin 2018

ans après la découverte et l'identification de l'agent causal du SIDA, le combat reste loin d'être gagné, malgré l'amélioration remarquable dans les méthodes de prévention et de

détection, la création de nouveaux traitements, et la meilleure prise en charge des personnes infectées. En 2015, 1,1 million de décès reliés au SIDA ont été recensés, avec environ 36,7 millions de personnes infectées par le VIH, pour la grande majorité, en Afrique de l'Est et du Sud (GARPR 2016; UNAIDS 2016 estimates, URL : http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/global-AIDS-update-2016_en.pdf, Date de visite : 18 Juin 2018). Le VIH a maintenu sa prévalence ainsi que son incidence pendant plus de 35 ans grâce à plusieurs facteurs virologiques comme son profil de pathogenèse, les mécanismes de transmission d'hôtes à hôtes, ainsi que des facteurs économiques et sociaux.

1.2 L'infection par le VIH

L'infection par le VIH est transmise lorsque des fluides biologiques (sang, sperme...) d'une personne infectée entrent en contact avec les membranes muqueuses intactes ou endommagées, des lésions cutanées, ou encore par inoculation parentérale. Cela inclut donc des voies de transmissions sexuelles (qui reste la voie de transmission la plus répandue), transfusions sanguines, utilisations de drogues à injections intraveineuses, transmissions verticales de la mère à l'enfant ainsi que par la transplantation d'organes (Seitz 2016). La première phase clinique dans la pathogenèse du VIH, dite phase aigüe de l'infection, provoque une diminution significative du nombre de lymphocytes T CD4⁺ dans les premières semaines, et est accompagnée de symptômes non spécifiques. (Figure 2) Cette attaque ciblée est une conséquence directe de la nature lymphotrope du VIH, impliquant la liaison entre la glycoprotéine virale gp120 et ses ligands, le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5 ou CXCR4 (Dean et al. 1996). À la suite de cette déplétion de lymphocytes T CD4⁺ provoquée par l'effet cytopathique de la réplication virale, la charge virale augmente considérablement

puis diminue concomitamment à une première phase de réponse humorale, majoritairement composée d'IgMs (Immunoglobulines de types M) dirigées contre une région variable de la gp120. Ces anticorps ne sont en revanche pas suffisants pour protéger l'hôte à long terme des quasi-espèces produites à chaque cycle de réplication. La réponse T CD8+ cytotoxique agit aussi en parallèle de la réponse humorale et participe grandement au contrôle initial de la virémie par différents mécanismes comme la reconnaissance des cellules infectées via la présentation antigénique, ou encore la production de facteurs solubles inhibant la transcription (Gulzar and Copeland 2004). En effet, le VIH possède une excellente capacité d'adaptation provenant des mutations causées par la transcriptase inverse, l'enzyme responsable de la transformation du génome ARN simple brin en un génome d'ADN double brin (Kong and Sattentau 2012).

Au cours de la seconde phase de l'infection, ou phase de latence clinique ou asymptomatique,

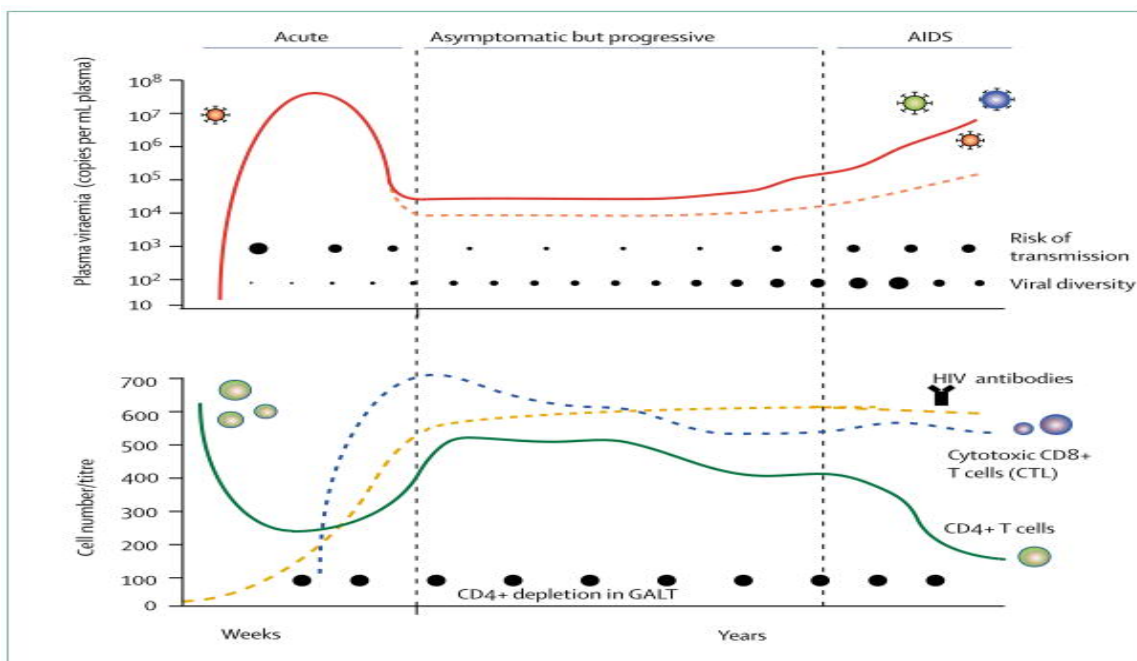


Figure 2. Schéma du cours d'une infection classique par le VIH chez les individus non traités. Provenant de (Simon, Ho, and Abdool Karim 2006)

la charge virale demeure basse et relativement stable. En revanche, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ continue de décroître pendant des mois voire des années. Cette décroissance est causée par une hyper activation du système immunitaire, découlant de la nature chronique de l'infection ainsi qu'à des effets indirects de l'infection par le VIH, comme la translocation microbienne causant une inflammation chronique (Reid et al. 2018) provoquée par la dégradation de l'intégrité de la muqueuse intestinale. À la suite de cette diminution progressive du nombre de lymphocytes T CD4⁺, la troisième phase de l'infection est caractérisée par la progression de l'individu en phase SIDA au cours de laquelle la déplétion marquée des lymphocytes T CD4⁺ s'accompagne d'une recrudescence de la charge virale. La pathologie de l'infection par le VIH-1 provient de sa virulence et de son tropisme cellulaire, qui aboutit après des années d'infection chronique à une insuffisance immunitaire sévère, augmentant considérablement la vulnérabilité de l'individu à une panoplie d'infections opportunistes (Seitz 2016), responsables ultimement de la mort de la personne infectée.

En 1985, l'AZT (3'-azido-3'-deoxythymidine), un agent initialement utilisé contre le cancer, a prouvé son efficacité dans l'inhibition de l'infectiosité et de l'effet cytopathique du VIH *in vitro* (Mitsuya et al. 1985). Depuis, des efforts considérables ont été fournis pour développer un traitement optimal inhiber la réplication virale chez les individus infectés par le VIH. Présentement, il existe plus de 30 molécules antirétrovirales très efficaces comme l'Efavirenz (inhibiteur de transcriptase inverse non nucléosidique), le Raltegravir (inhibiteur d'intégrase) ou encore l'Atazanavir (inhibiteur de protéase), toutes ciblant des étapes critiques du cycle de réplication viral, comme la transcription inverse, l'intégration du génome du virus chez celui de l'hôte et la maturation des protéines virales respectivement (Meintjes et al. 2017). L'apparition de la trithérapie antirétrovirale, basée sur l'utilisation de composés ciblant

différentes étapes du cycle de réplication du VIH-1, a permis une diminution remarquable de la charge virale chez les patients infectés, et a ainsi diminué fortement la morbidité ainsi que de la mortalité de l'infection par le VIH-1 et du SIDA (Arts and Hazuda 2012). Ces traitements ne sont pas sans effets secondaires, et demandent beaucoup de ressources financières, d'organisation, de suivis et bien d'autres facteurs compliquant l'accessibilité, la prise en charge ainsi que l'adhérence aux traitements. Plus récemment, des approches visant à réduire le poids des traitements tout en conservant leur efficacité ont été envisagées, comme des monothérapies préservant la qualité de vie des individus, conservant aussi une haute capacité de suppression virale (Pasquau et al. 2018). Le fait qu'une grande proportion de pays à faibles revenus n'avait pas accès aux traitements (Giuliano and Vella 2007) a incité à augmenter les efforts de distribution et d'accessibilité aux traitements dans ces régions du globe (Loewenson and McCoy 2004). Malgré une excellente efficacité des traitements dans la suppression virale, la réalité est qu'il n'existe pas de traitement à finalité curative. Comme la figure 3 le montre, lorsque la pression des agents antirétroviraux est interrompue, une

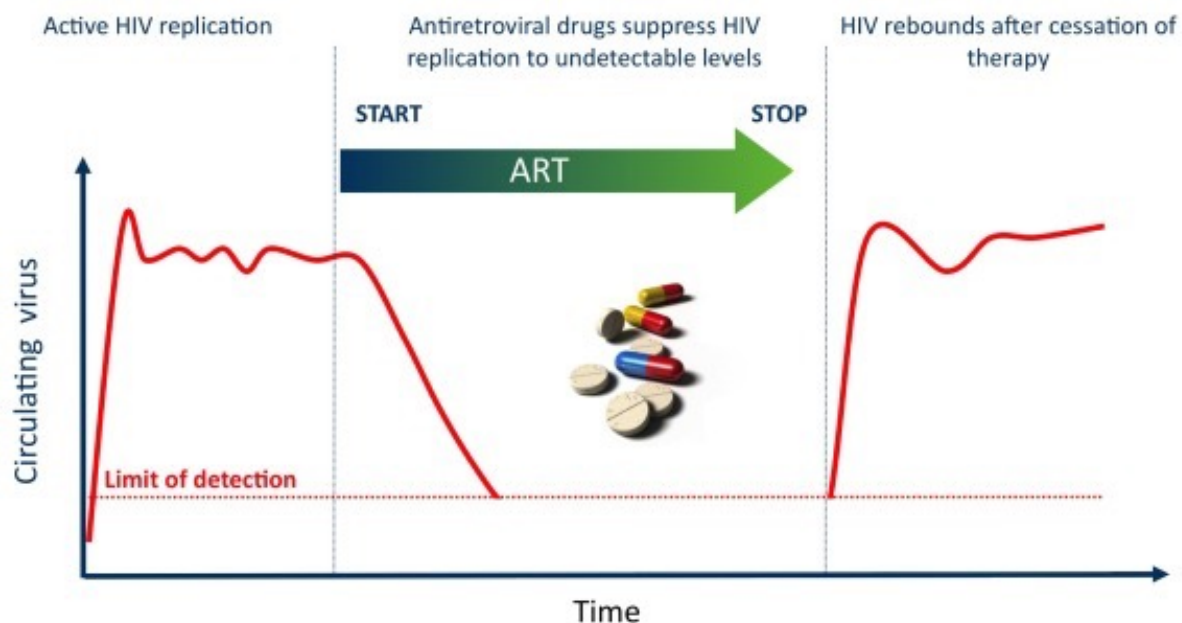


Figure 3. Représentation schématique du concept de rebond viral lors de l'arrêt du traitement antirétroviral. Provenant de (Kulpa and Chomont 2015)

augmentation de la charge virale plasmatique est observée, et même une prise en charge très précoce suite à l'infection par le VIH-1 ne protège pas les individus contre cette recrudescence virale (Henrich et al. 2017). Cela signifie donc que le VIH possède des mécanismes intrinsèques lui permettant de persister à travers le temps chez les individus traités pendant des années et de causer un rebond viral suite à l'arrêt du traitement (Kulpa and Chomont 2015). C'est pour cette même raison que la bataille contre le VIH reste une des plus difficiles, car malgré toutes les ressources mobilisées pour l'éradiquer, il n'existe aucun traitement curatif. Le VIH reste dormant, invisible au système immunitaire, et resurgit dans l'organisme une fois la pression thérapeutique levée.

1.3 Cycle viral

Afin de mieux comprendre le contexte d'établissement de la latence, il est important de mentionner les mécanismes biologiques qui sous-tendent la réplication du VIH, représentés de façon simplifiée dans la figure 4.

Le VIH entre dans la cellule cible par un processus de fusion de la bicouche lipidique de l'enveloppe virale avec celle de la membrane plasmatique cellulaire grâce aux interactions entre ses glycoprotéines de l'enveloppe avec les récepteurs et corécepteurs cellulaires (Wilen,

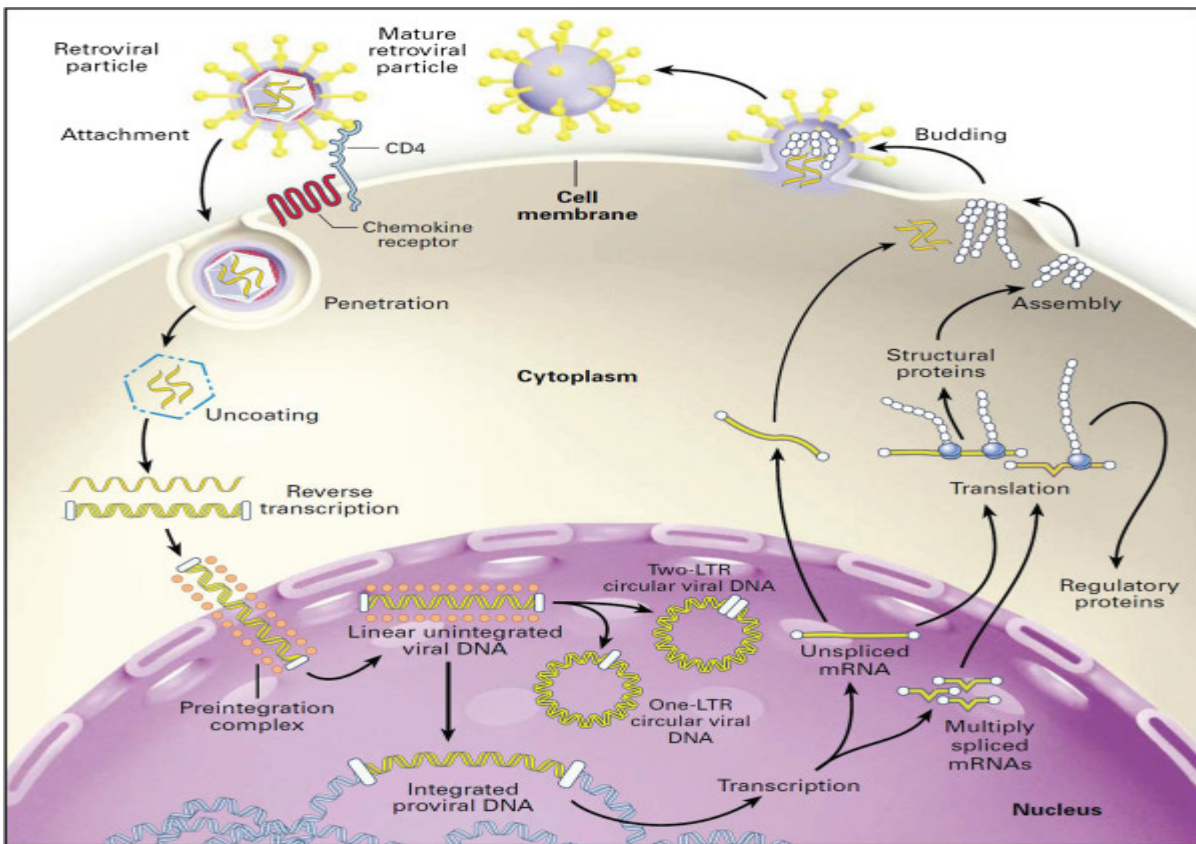


Figure 4. Représentation schématique du cycle viral du VIH provenant de (Furtado et al. 1999)

Tilton, and Doms 2012). Cela permet ainsi à la capside virale de pénétrer dans le cytosol et de rétro transcrire le génome ARN du VIH en ADN double brin grâce à la transcriptase inverse virale. Par la suite, le génome viral est transporté jusqu'au noyau par des éléments du cytosquelette (McDonald et al. 2002) et, grâce à l'intégrase virale, s'intègre dans le génome de l'hôte sous forme de provirus (Craigie and Bushman 2012). Le génome du VIH est flanqué de deux régions LTR (*long terminal repeats*) (Figure 5). La région 5'*LTR* a pour fonction principale d'agir comme région promotrice de la transcription du VIH. Elle contient les régions *U3*, *R* et *U5* contenant la majorité des régions liant plusieurs facteurs de transcription comme AP-1, SP1, NFAT, NF- κ B nécessaires à la transcription des gènes viraux. (Pereira et al. 2000). La région *gag* code pour les protéines de structure du virion, que sont la capside, la nucléocapside et la protéine de matrice externe. La région *Pol* code pour les composantes enzymatiques du virion, que sont l'intégrase, la transcriptase inverse et la protéase (Seitz 2016). Plus en aval du génome se trouve la région codante pour les deux glycoprotéines de l'enveloppe, soit la protéine de surface gp120 et la protéine transmembranaire, gp41. Il est important de décrire les protéines de régulations, qui permettent de former un virion capable d'engendrer des cycles réplcatifs optimaux et de moduler la quantité et la nature des transcrits du VIH. Les protéines Tat (*transactivator protein*) et rev (*RNA splicing regulator*) ont pour fonction respective d'augmenter drastiquement l'efficacité de la transcription et d'exporter les ARN mono- et non-épissés du noyau au cytosol. Les protéines Vif, Vpr, Vpu et Nef contribuent à la virulence *in vivo*, comme le bourgeonnement des particules virales hors de la cellule hôte, ainsi que la modulation de la pathogenèse du VIH en empêchant entre autres, l'action de facteurs de restrictions cellulaires (Levy 1993).

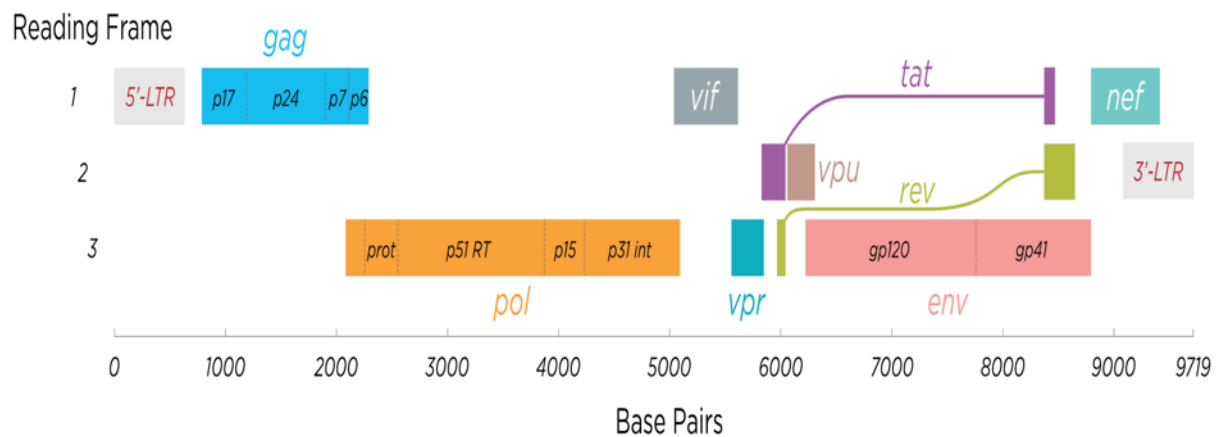


Figure 5. Structure génétique du génome du VIH-1. Provenant de “Structure and genome of HIV” dans *Wikipedia, l’encyclopédie gratuite*, <https://en.wikipedia.org/wiki/HIV>, date de visite: 18 Juin 2018

Suite à l’intégration du provirus dans le génome de l’hôte, le processus de transcription débute. Lors d’un cycle de réplication classique, le VIH produit en premier lieu des ARN complets qui vont être polyépissés par la machinerie d’épissage cellulaire, donnant ainsi naissance aux transcrits codant pour les trois protéines virales, Tat, Rev et Nef (*negative factor* pour ce dernier) (Karn and Stoltzfus 2012). Ces trois protéines précoces sont cruciales pour moduler les niveaux de transcription du VIH. En effet, Tat interagit avec un facteur de transcription cellulaire, P-TEFb, composé de la cycline T1 ainsi que la kinase CDK9 (Asamitsu and Okamoto 2017). La formation de ce complexe permet sa liaison à une région en boucle retrouvée sur la région 5’ du nouveau transcrit viral, soit la région TAR (*trans activating response element*) (D’Orso et al. 2012). L’interaction entre le complexe Tat/P-TEFb/TAR favorise la phosphorylation du domaine C terminal de l’ARN polymérase II et

permet une élongation de la transcription efficace du VIH (Vaishnav and Wong-Staal 1991) (Ramakrishnan et al. 2012).

À la suite de l'élongation des transcrits, une concentration croissante de transcrits mono- et non-épissés, codant pour de multiples protéines, s'accumule dans le noyau. Les transcrits plus tardifs possèdent tous des signaux d'épissage ou des signaux de rétention nucléaire empêchant l'export des ARN dans le cytosol. Une propriété commune de ces transcrits est la présence d'une région RRE (*Rev responsive element*) d'environ 350 paires de bases. La liaison de cette région par la protéine Rev permet l'export de ces ARN vers le cytosol pour être à leur tour traduits en protéines virales (Fernandes, Jayaraman, and Frankel 2012). Les différentes protéines virales s'assemblent et forment des particules virales précoces non infectieuses nécessitant une étape de maturation. La polyprotéine Gag est clivée en plusieurs protéines de structure par une protéase virale lors de l'étape de maturation, permettant ainsi la formation des virions infectieux (Sundquist and Krausslich 2012). Ces nouvelles particules virales vont ainsi pouvoir entamer de nouveaux cycles d'infection sur de nouvelles cellules cibles.

1.4 Les réservoirs latents

L'infection latente du VIH est établie dans certains lymphocytes T CD4⁺ (Pierson, McArthur, and Siliciano 2000) et a pour conséquence de diminuer drastiquement son activité biologique de transcription et de traduction, lui permettant de rester invisible du système immunitaire et d'établir ainsi des réservoirs viraux. Il est important de noter la présence d'autres réservoirs cellulaires, par exemple les monocytes et macrophages. Bien que sujet à controverse, plusieurs publications ont rapporté la présence de VIH-1 dans différents types de

macrophages (Deleage et al. 2011) (Damouche et al. 2015). Par ailleurs, le cerveau contiendrait aussi des cellules réservoirs comme les microglies et les astrocytes (Marban et al. 2016). Cela dit, les cellules du réservoir latent du VIH sont majoritairement des lymphocytes T CD4⁺ mémoires au repos (Churchill et al. 2016), possédant une très longue demi-vie et contenant des provirus compétents pour la réplication (Pierson, McArthur, and Siliciano 2000). Ces lymphocytes peuvent donc, une fois leur antigène et les signaux nécessaires de stimulation présents, s'activer et produire de nouveaux virions capables d'infecter de nouvelles cellules (une fois la pression antirétrovirale stoppée). Il n'est donc pas surprenant que ces cellules soient au centre de l'intérêt dans la recherche pour l'éradication du VIH, bien qu'il existe aussi d'autres facteurs et d'autres cellules potentiellement responsables (sanctuaires anatomiques, cellules dendritiques, monocytes) (Kandathil, Sugawara, and Balagopal 2016).

De manière générale, deux possibilités peuvent expliquer la persistance du VIH au sein de cette population cellulaire. La première, soit la réplication résiduelle, consisterait en la production de nouvelles particules virales infectieuses ayant la capacité d'infecter les cellules avoisinantes, malgré la thérapie antirétrovirale. Cette réplication résiduelle pourrait par exemple être favorisée dans des sanctuaires anatomiques où les traitements administrés auraient une diffusion limitée, diminuant ainsi leur concentration locale (Saksena et al. 2010). En revanche, il existe des études récentes stipulant que cette production résiduelle observée chez les personnes sous traitement serait très limitée et proviendrait d'activation intermittente de cellules réservoirs, et non de cycles de réplication virale complets (Van Zyl et al. 2017).

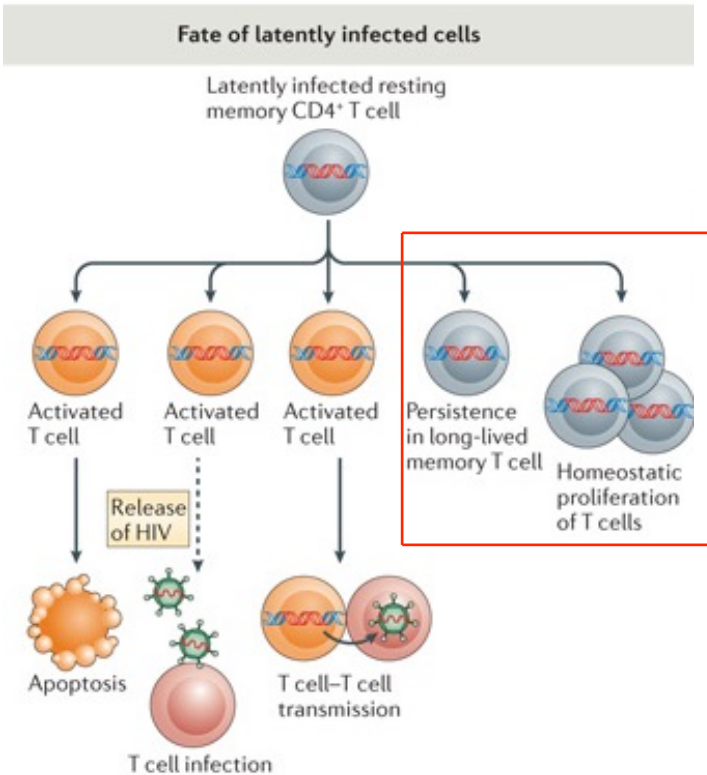


Figure 6. Représentation schématique des différents destins d'une cellule T CD4⁺ mémoire infecté de manière latente. L'encadré en rouge représente le mécanisme largement accepté expliquant la persistance du VIH. Modifiée de (Cure et al. 2012)

Le deuxième mécanisme proposé, et largement accepté par la communauté scientifique, est la présence de lymphocytes T CD4⁺ mémoires à très longue vie. Cette population cellulaire possède la capacité de maintenir le provirus à travers le temps grâce à la prolifération homéostatique et à la longue survie de ces cellules (Figure 6). D'une autre part, la déplétion de lymphocytes T CD4⁺ causée par le VIH provoque une forte activation immunitaire, partiellement causée par la translocation microbienne du

système gastro-intestinal, ainsi qu'une prolifération marquée des lymphocytes T CD4⁺, et une potentielle augmentation de la population de cellules portant le provirus (Anthony et al. 2003).

Au sein même de ces lymphocytes T CD4⁺ mémoires, il existe de sous-populations cellulaires dans lesquelles le VIH est capable d'établir une latence préférentielle. Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires « centrales » et « transitionnelles » (T_{CM} et T_{TM} respectivement) sont les sous-populations contribuant le plus à la persistance virale (Chomont et al. 2009) (Figure 7).

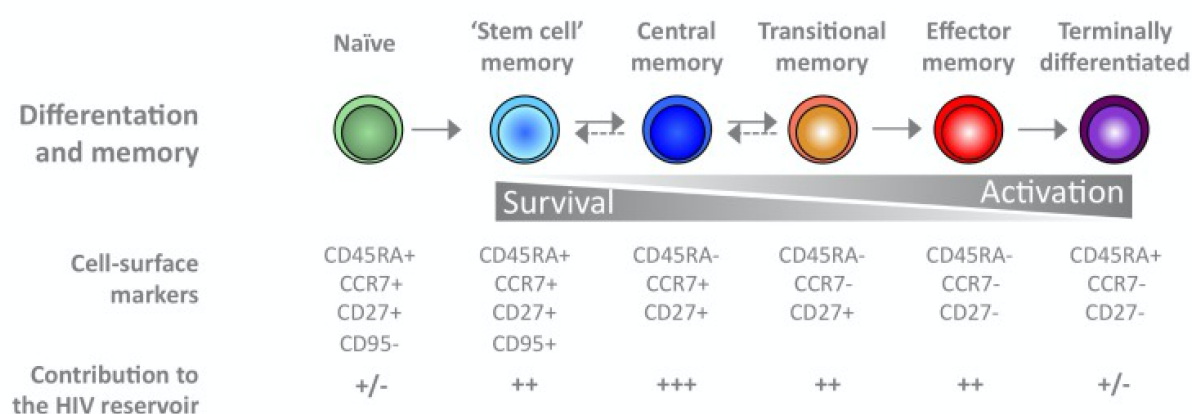


Figure 7. Représentation schématique de la différenciation des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ ainsi que de leur contribution relative au réservoir. Modifiée de (Kulpa and Chomont 2015)

Le mécanisme d'établissement de latence au sein de ces cellules n'est pas encore totalement élucidé, mais il est certain qu'il existe plusieurs facteurs complexes à cette observation discutés plus tard dans ce chapitre. Il est clair que les T CD4⁺ mémoires au repos représentent une grande proportion de réservoirs latents. Par ailleurs, des études montrent que l'établissement de la latence peut aussi provenir de l'infection de lymphocytes T CD4⁺ activés, qui part la suite, retourneraient dans un état de repos et permettraient ainsi l'établissement de la latence (Chavez, Calvanese, and Verdin 2015). Les facteurs déterminants si une cellule donnée est plus à même d'établir un réservoir latent sont encore en exploration, mais il existe

des critères qui peuvent favoriser ce processus. Ces critères peuvent être des propriétés cellulaires, comme un remodelage de la transcription cellulaire favorisant la latence (Shan et al. 2017), ou bien des mutations virales dans la protéine Tat, favorisant un contexte transcriptionnel latent (Kamori and Ueno 2017), ainsi que d'autres mécanismes viraux et cellulaires abordés plus tard.

Il est aussi important d'étudier les réservoirs viraux comme un concept non statique. Bien qu'une partie soit compartimentée dans différents sites anatomiques, par exemple les tissus lymphoïdes périphériques, le tractus gastro-intestinal, génital ainsi que le cerveau (Saksena et al. 2010), les lymphocytes infectés par le VIH de façon latente peuvent par exemple entrer en phase d'expansion suite à une activation antigénique, et ainsi augmenter la taille du réservoir latent (Kwon and Siliciano 2017). Par ailleurs, les réservoirs viraux circulent aussi à travers les systèmes sanguins et lymphatiques et ont donc sont capables de migrer dans différents tissus (Barton, Winckelmann, and Palmer 2016). Les différents sites anatomiques ont des propriétés distinctes qui compliquent grandement les stratégies d'éradication. La mise au point de techniques permettant la mesure et la caractérisation des réservoirs viraux est devenue très importante d'un point de vue aussi bien clinique que fondamental. La mesure de l'ADN du VIH intégré par des techniques très sensibles de PCR repose sur l'utilisation d'oligonucléotides spécifiques et conservés de régions du VIH et de séquences répétées du génome humain (*Alu*). C'est une méthode robuste permettant d'évaluer la fréquence de cellules portant des génomes viraux intégrés au sein d'une population donnée (Yu et al. 2008). Toutefois, il est important de noter qu'une très grande proportion de provirus sont défectifs (>95%), et n'auront pas la capacité d'induire des virions réplcatifs (Ho et al. 2013) en raison de mutations et de délétions présentes dans tout le génome (Bruner et al.

2016). La mesure d'ADN intégré n'exclut pas les provirus défectifs de ces mesures et c'est pourquoi de nouvelles méthodes davantage fonctionnelles, réalisées en dilution limite, comme le *TILDA* (*Tat-Rev Induced Limiting Dilution Assay*) ont été mises au point pour mesurer la fréquence de cellules inductibles exprimant l'ARN Tat-Rev. En mesurant la production d'ARN polyépisé Tat-Rev, cette technique mesure la fréquence de lymphocytes capable de transcrire l'ARN minimal requis pour atteindre une transcription efficace du VIH après stimulation. Cette technique mesure donc une fréquence de cellules qui peuvent être induites pour produire des transcrits viraux et évite de quantifier l'ensemble des virus défectueux (ceux qui par exemple contenant des mutations ou délétions dans la région Tat-Rev) (Procopio et al. 2015). En revanche, la technique TILDA n'exclut pas la possibilité de mesurer des provirus capables de produire de l'ARN Tat-Rev, mais incapables de produire des virions réplcatifs, et n'exclut pas non plus la possibilité qu'un provirus n'ait pas été réactivé efficacement lors de la stimulation. Une méthode de référence basée sur une coculture cellulaire en dilution limite, le Q-VOA (*Quantitative Viral Outgrowth Assay*), mesure la fréquence des cellules qui contiennent des génomes viraux compétents à la réplication (Finzi et al. 1997) (Laird et al. 2016). Cette approche implique, comme le *TILDA*, une étape de réactivation provirale, et mesure la proportion de cellules portant des virus inductibles et compétents à la réplication dans un test de dilution limite. Elle est considérée comme la méthode de mesure la plus représentative des réservoirs potentiellement capables de provoquer un rebond viral lors de l'arrêt de traitement (Fun et al. 2017).

1.5 La latence et ses implications

La latence est un des mécanismes par lequel le VIH est capable de persister à travers le temps. Cette latence est la cause du rebond viral observé lors de l'arrêt de traitement et il n'est pas étonnant que beaucoup de ressources soient investies dans des stratégies thérapeutiques ayant pour but de réactiver le virus de sa latence (Datta et al. 2016). Un concept thérapeutique a fait surface depuis quelque année nommé le « shock and kill » (Figure 8).

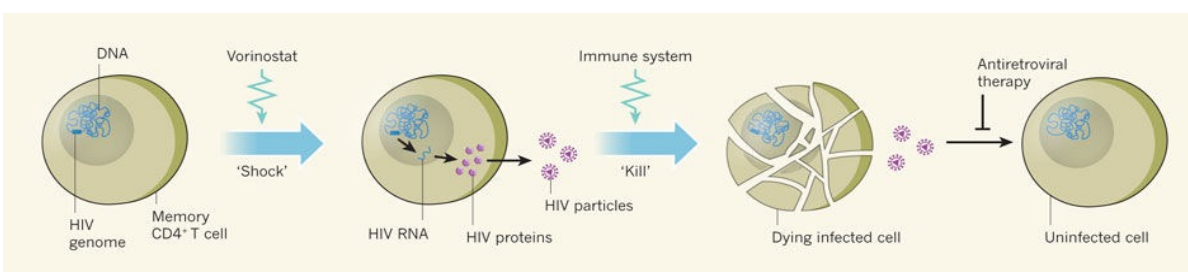


Figure 8. Représentation schématique simplifiée du concept de “Shock and Kill” Provenant de (Deeks 2012)

Ce concept a pour principe de réactiver le virus latent au sein des cellules réservoirs avec l'aide d'agents pharmacologiques poussant le virus hors de sa latence et permettant la production de nouvelles protéines virales, ainsi que de nouveaux virions. La production de nouvelles particules virale, ou même uniquement de protéines virales pourrait ainsi mener à la présentation classique antigénique aux cellules du système immunitaire et provoquer leur reconnaissance et leur élimination, en combinaison avec l'effet cytopathique de la réplication du VIH au sein de la cellule (Thorlund et al. 2017). Bien sûr il convient de maintenir l'individu sous traitement antirétroviral, pour empêcher de nouveaux cycles d'infection. Une des méthodes de réactivation du VIH de sa latence repose sur l'utilisation de différentes familles de composés pharmacologiques appelés agents anti-latence (AAL, Tableau 1).

Composés	Famille	Effet
Panobinostat	HDAC inhibiteur	Empêche la déacétylation des histones et augmente l'accessibilité des facteurs de transcription au 5'LTR
Romidepsine	HDAC inhibiteur	Empêche la déacétylation des histones et augmente l'accessibilité des facteurs de transcription au 5'LTR
JQ-1	Inhibiteur de bromodomaine	Augmente la formation du complexe Tat/P-TEFb en se liant à l'inhibiteur Brd4
Ingénol	Agoniste de PKC	Active les voies NF-κB et P-TEFb
Bryostatine	Agoniste de PKC	Active les voies NF-κB et P-TEFb
PMA-Ionomycine	Agoniste de PKC	Active les voies NF-κB et P-TEFb

Tableau 1. Résumé des propriétés des agents anti-latence utilisés

Par exemple, la famille des HDACi (*inhibiteurs d'histones déacétylases*) comme le panobinostat ou la romidepsine, induisent des modifications épigénétiques au sein de la cellule en empêchant la déacétylation des histones. Cela permet une décondensation de la chromatine et permet une meilleure accessibilité des différents facteurs de transcription cellulaires au 5'LTR du VIH (Van Lint, Bouchat, and Marcello 2013) (Manson McManamy et al. 2014). Le JQ-1 (famille des *BET bromodomain inhibitors*), dissocie Brd4 du facteur de transcription cellulaire P-TEFb et permet ainsi une élongation de la transcription accrue des gènes du VIH (Li et al. 2013) en permettant la liaison de Tat au facteur de transcription P-TEFb qui est crucial pour une élongation efficace des transcrits (Asamitsu and Okamoto 2017). Les agonistes de PKC (*Protéine Kinase C*) par exemple l'ingénol ou la bryostatine, augmentent la disponibilité de NF-κB et de P-TEFb, deux facteurs de transcription cellulaires importants pour l'initiation et l'élongation de la transcription du VIH (Diaz et al. 2015) et permettent ainsi de réduire la latence transcriptionnelle. Plusieurs études cliniques utilisant certains de ces agents pharmacologiques ont montré une absence de réduction de la taille du réservoir viral,

suggérant que les stratégies de « shock and kill » existantes sont inefficaces (Rasmussen et al. 2014) (Delagreverie et al. 2016).

Le fait que la latence soit dépendante d'une multitude de facteurs cellulaires et viraux complique grandement la caractérisation des mécanismes qui la gouvernent. Pour réactiver le VIH de sa latence de manière optimale, il est important de comprendre et de caractériser les mécanismes de latence avant de tenter de le moduler. Des études ont montré que le génome du VIH s'intègre préférentiellement dans des régions transcriptionnellement actives, mais qu'il est tout de même capable d'entrer en état de latence, reflétant un paradoxe (Schroder et al. 2002). Des mécanismes épigénétiques comme la déacétylation des histones par les HDAC (histones déacétylases) (Van Lint, Bouchat, and Marcello 2013) ainsi que la méthylation des histones et de l'ADN (Margolis 2010) favorisent la latence transcriptionnelle (Figure 9). Ces altérations épigénétiques favorisent une conformation condensée de la chromatine et diminuent ainsi l'accessibilité des facteurs de transcription cellulaires aux promoteurs cellulaires et du VIH. Ainsi, une décondensation de la chromatine permet une meilleure accessibilité aux régions promotrice du VIH et permet une augmentation de la transcription (Verdin, Paras, and Van Lint 1993).

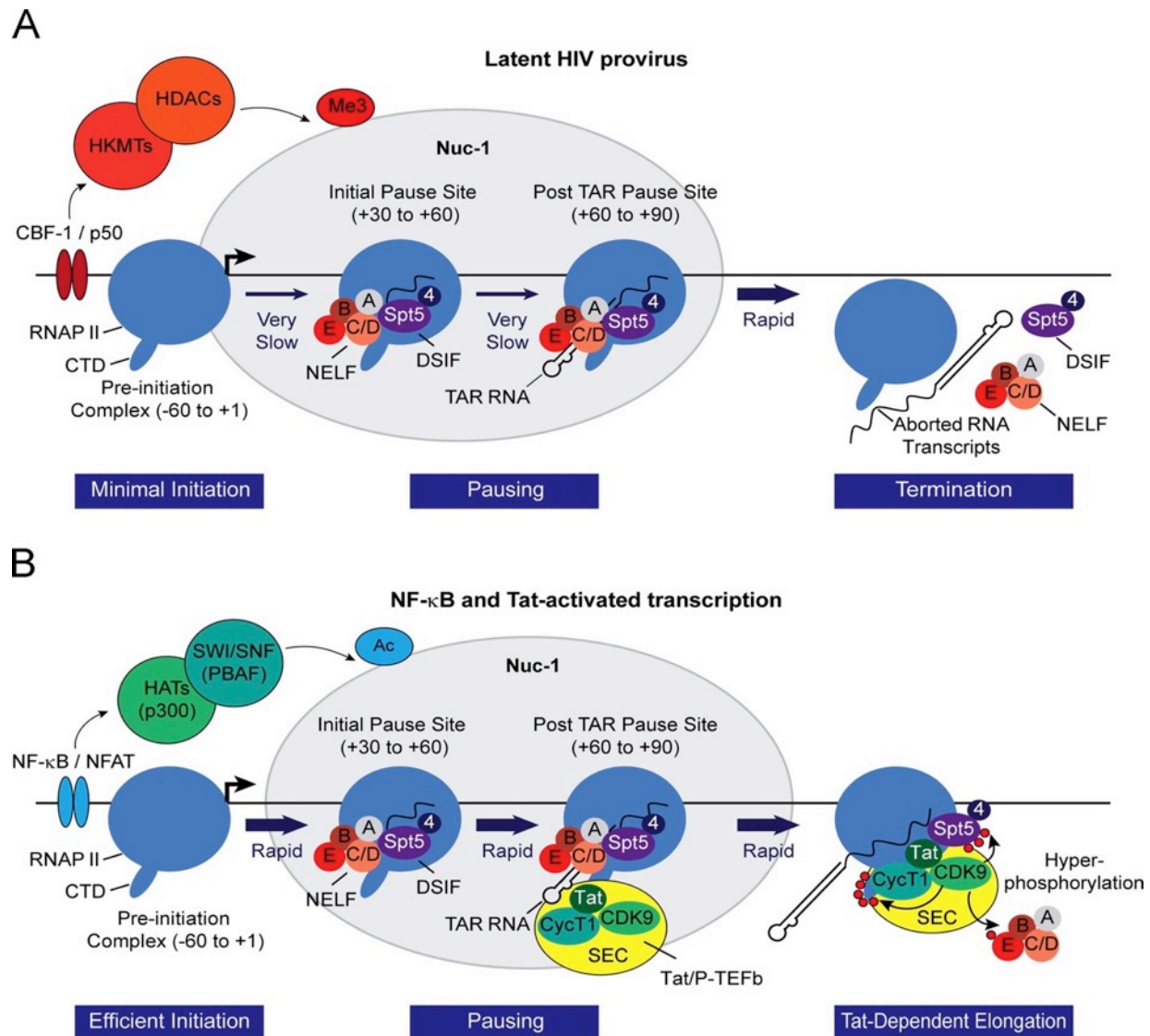


Figure 9. Régulation épigénétique et transactivation par NF-kappaB et Tat de la transcription du VIH.
A) Etat latent du VIH. B) Activation de la transcription par différents facteurs. Provenant de Mbonye, U. 2014

La présence du nucléosome Nuc-1 sur la région 5' *LTR* du VIH interfère avec la liaison de certains facteurs de transcription requis pour la transcription du VIH. Certaines protéines de remodelage nucléosomique comme SW1/SNF permettent de changer la conformation de Nuc-1 et ainsi d'augmenter l'efficacité de transcription du VIH (Williams and Greene 2007). Par ailleurs, la présence de facteurs d'inhibition cellulaires comme NELF (*negative transcription elongation factor*), en se liant à la région TAR du VIH, empêchent l'élongation de la transcription (Zhang et al. 2007). Il est intéressant de constater que la latence semble être modulée par des mécanismes cellulaires, mais aussi par des mécanismes intrinsèques au VIH. En effet, la latence peut aussi être influencée par une boucle de rétroaction transcriptionnelle négative de la protéine virale Tat. Pour que Tat puisse fonctionner de façon optimale, il est nécessaire que les quantités de cette protéine dépassent un seuil minimal. S'il n'est pas atteint, une chute drastique dans les événements d'élongation du VIH sera observée, induisant une diminution générale de la sa transcription (Karn 2011). Des études subséquentes ont observé qu'un des mécanismes potentiels participant à l'établissement de la latence serait l'interférence transcriptionnelle (Lenasi, Contreras, and Peterlin 2008), caractérisée par une ségrégation des facteurs de transcription cellulaires aux promoteurs cellulaires, en amont du promoteur du VIH, diminuant ainsi l'activité du promoteur viral. L'interférence transcriptionnelle a été montrée, mais ne semble pas être le mécanisme principal dans la maintenance de la latence (Yukl et al. 2018). Cette même étude a montré que la latence du VIH ne correspondait pas à un état transcriptionnel complètement inactif: de courts transcrits abortifs sont présents dans la majorité des cellules contenant un provirus. De plus, la mise en évidence et l'étude de blocages à différentes étapes de la transcription a permis de montrer que ce sont les processus distaux de la transcription qui sont le plus inhibés à l'état de latence. Ces

observations ont mené à la conclusion qu'il existe potentiellement des blocages dans l'élongation, la maturation ainsi que le polyépissage des transcrits du VIH à l'état de latence (Yukl et al. 2018). La latence est non seulement modulée par des facteurs protéiques cellulaires et viraux, mais aussi par des mécanismes intrinsèques à la structure génétique même du VIH. Plus de 40 formes d'épissage alternatif sont retrouvées dans le transcriptome du VIH (Karn and Stoltzfus 2012), et la nature de ces transcrits est régulée par des régions génomiques conservées du VIH, soit des éléments régulateurs d'épissage. Des mutations dans certaines de ces régions peuvent ainsi causer une expression préférentielle de certains transcrits épissés, diminuant les niveaux de production virale (Karn and Stoltzfus 2012). La latence du VIH résulte donc d'une multitude de facteurs interagissant entre eux, résumés dans la figure 10.

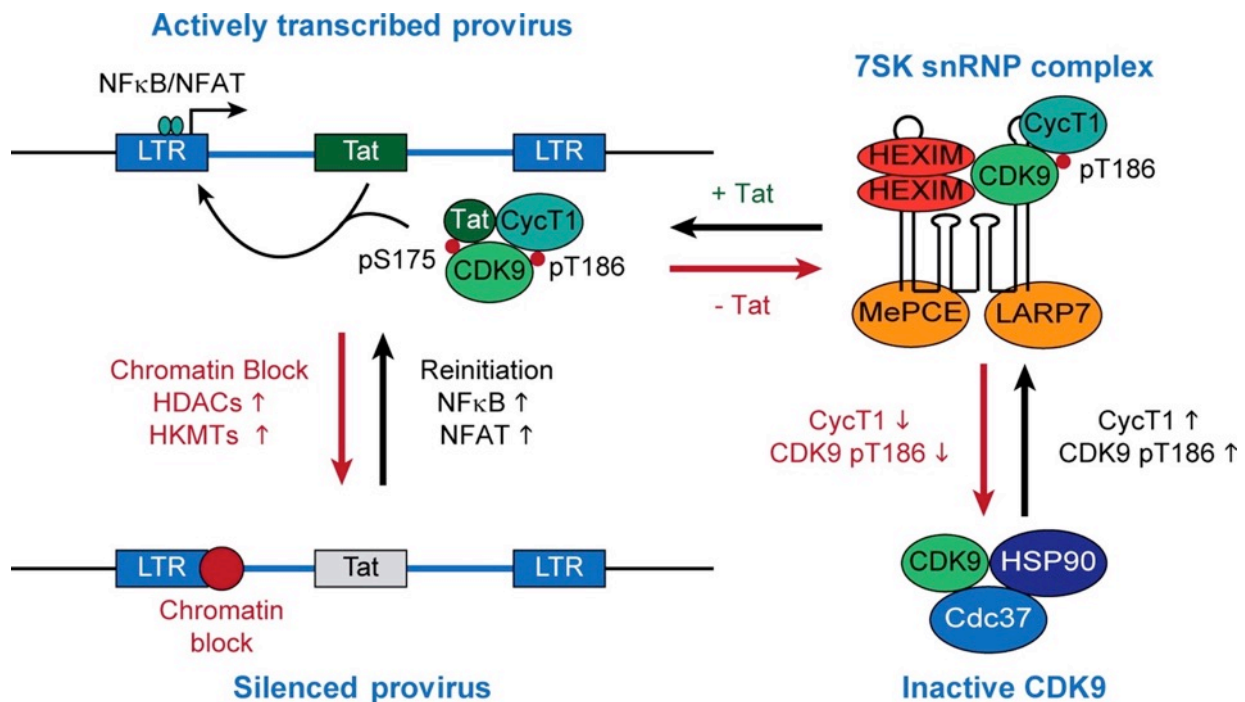


Figure 10. Schéma récapitulatif des mécanismes d'activation et d'inhibition de la transcription du VIH.
Provenant de (Mbonye and Karn 2014)

La latence du VIH est donc un phénomène conséquent d'une multitude de facteurs différents et est préférentiellement maintenue dans les lymphocytes T CD4⁺ au repos dû à leur état de quiescence (Churchill et al. 2016). Cet état de quiescence cellulaire est caractérisé entre autres par une diminution en la disponibilité en P-TEFb dans ces cellules (Adams et al. 1994), causée par la liaison inhibitrice de protéines HEXIM1 avec les complexes CDK9/cyclin T (P-TEFb) (Michels et al. 2004) (Nguyen et al. 2001). Certains facteurs de transcription importants pour la transcription du VIH, comme NF-κB ou NFAT sont cruciaux pour permettre l'initiation de la transcription du provirus et sont des éléments importants dans la régulation de la latence. Elle est aussi étroitement reliée aux mécanismes de contrôles épigénétiques, comme la déacétylation des histones par les HDAC, favorisant une chromatine condensée et moins accessible pour les facteurs de transcription (Figure 10).

La complexité intrinsèque de la latence du VIH nous a amené à choisir un angle d'analyse transcriptionnel pour tenter de comprendre une partie de son mécanisme. Nous nous sommes donc posé la question suivante : quelles sont les étapes dans la transcription du VIH qui sont le plus bloquées à l'état de latence dans les lymphocytes T CD4⁺ totaux ainsi que les sous-populations mémoires à l'état de latence, et comment pouvons-nous agir pour maximiser la réactivation de la transcription du VIH au sein de ces cellules? Par ailleurs, est-ce que les blocages dans la transcription sont de même nature au sein de sous-population T CD4⁺ mémoires distinctes? Nous définissons la latence dans ce travail comme l'absence ou l'infime production de particules virales, et non comme une absence de transcription. Nous avons fait ce travail dans le but de mieux comprendre les différences transcriptionnelles présentes à l'état de latence, au sein de différentes populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires. Nous nous sommes intéressés au profil transcriptionnel dans le but de comparer la proportion de

différents transcrits entre eux, et ainsi potentiellement distinguer les étapes limitantes dans la transcription à l'état de latence, en fonction des populations cellulaires étudiées. Par l'identification de certaines étapes limitantes dans le processus de transcription, ce travail a permis de déterminer lesquelles d'entre elles pourraient être ciblées pour réactiver la transcription du VIH de manière optimale et ainsi le forcer hors de sa latence. En fonction des blocages transcriptionnels, différentes familles d'agents anti-latence pourront être sélectionnées pour agir sur des étapes clefs de la transcription.

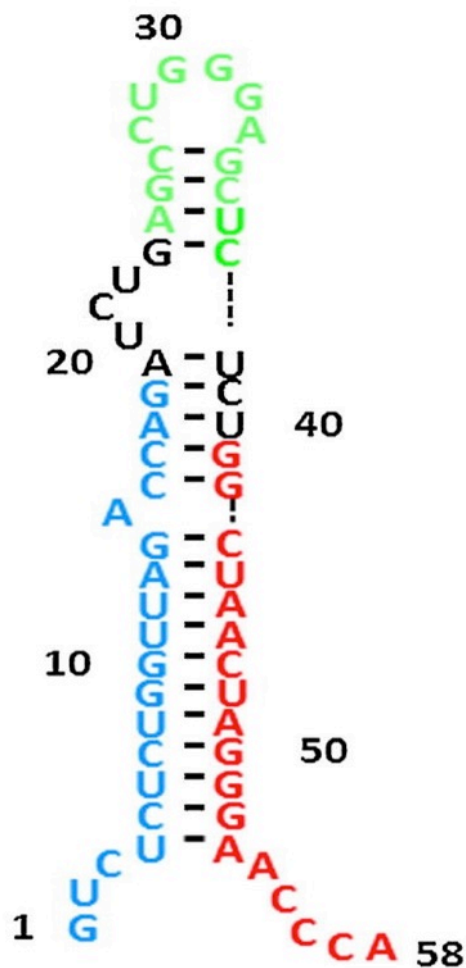


Figure 11. Représentation schématique de la boucle Tar. A l'état latent, l'élongation de la transcription du VIH est bloquée et produit une grande quantité de transcrits TAR très courts. Provenant de (Kaiser et al. 2017)

Au cours de ce travail, nous avons développé des techniques de RT-PCR basées sur une méthode d'extraction d'ARN de cellules en masse. Elles permettent la quantification absolue sensible et robuste de différents transcrits (R, Pol, Poly-A, Tat-Rev, représentés sur la figure 12) produits dans une population cellulaire grâce à la génération de standards ARN produits par transcription *in vitro*. Chaque transcrit représente une étape dans le processus de transcription, soit l'initiation de l'élongation (R), l'élongation distale (Pol), la polyadénylation (Poly-A), et le polyépissage (Tat-Rev). Le transcrit R est localisé dans la région 5'*LTR* du génome du VIH. La transcription du VIH commence dans cette même région, et lors de la transcription du VIH à l'état latent, on retrouve une

grande proportion de transcrits très courts d'environ 59 nucléotides (figure 11) produits de manière sporadique et contenant une région de structure secondaire stable en boucle TAR (*TransActivation Response element*) mais n'arrivant pas jusqu'à la fin de la région *R* (Kaiser et al. 2017) (Kao et al. 1987). Les transcrits *R* représentent donc les événements d'initiation de l'élongation, soit une élongation poursuivie après la première étape de blocage aux régions proches du promoteur (Zhang et al. 2007). Par conséquent, il y a une région *R* dans chaque transcrit, quelle que soit sa nature. Le transcrit *Pol*, situé dans la région distale du gène *Pol* représente les événements d'élongation distale de la transcription. Le transcrit Poly-A a été choisi pour représenter les transcrits matures polyadénylés en 3'. La polyadénylation des transcrits a pour effet d'augmenter la stabilité, l'intégrité et l'exportation des transcrits dans le cytoplasme cellulaire (Bullen et al. 2014) (Guhaniyogi and Brewer 2001). Nous parlerons donc de transcrits matures pour désigner des transcrits polyadénylés. Finalement, les transcrits Tat-Rev, représentent les ARN polyépissés. Ces transcrits sont les acteurs primordiaux dans l'élongation de la transcription et l'exportation des ARN mono et non épissé dans le cytoplasme (Karn and Stoltzfus 2012).

L'hypothèse majeure de ce travail est qu'il existe des différences au niveau de l'état transcriptionnel latent au sein des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires. Cette hypothèse est basée sur la prémisse que les T_{CM} ainsi que les T_{TM} contribuent majoritairement au réservoir latent (Chomont et al. 2009) et par la présence de blocages dans l'élongation, la maturation et le polyépissage au sein de lymphocytes T CD4⁺ totaux (Yukl et al. 2018). Ce travail a pour but d'établir le profil transcriptionnel dans les lymphocytes T CD4⁺ totaux et mémoires à l'état de latence, ainsi que les sous-populations cellulaires composant cette population mémoire, soit les lymphocytes T CD4⁺ naïfs (T_N), centrales (T_{CM}), transitionnelles

(T_{TM}) et effectrices (T_{EM}). En plus de cela, nous proposons de visualiser les changements transcriptionnels induits par différents traitements modulant la latence du VIH pour tenter de déterminer quelle méthode est la plus efficace pour forcer le VIH hors de sa latence, et ainsi permettre une optimisation du « shock and kill ». Le développement de ces techniques de RT-PCR dans notre laboratoire offre un outil robuste, sensible et peu coûteux qui permet de déterminer de manière quantitative la proportion de différents transcrits au sein de populations cellulaires. Ces techniques de RT-PCR mises au point pourront être utilisées pour répondre à diverses questions, incluant la détermination du profil transcriptionnel des lymphocytes T CD4⁺ dans différents sanctuaires anatomiques ou tissus, l'impact du temps sous thérapie antirétrovirale sur le profil transcriptionnel des cellules latentes, mais également la mesure de l'activité des AALs *in vitro* ou *in vivo* dans des essais cliniques.

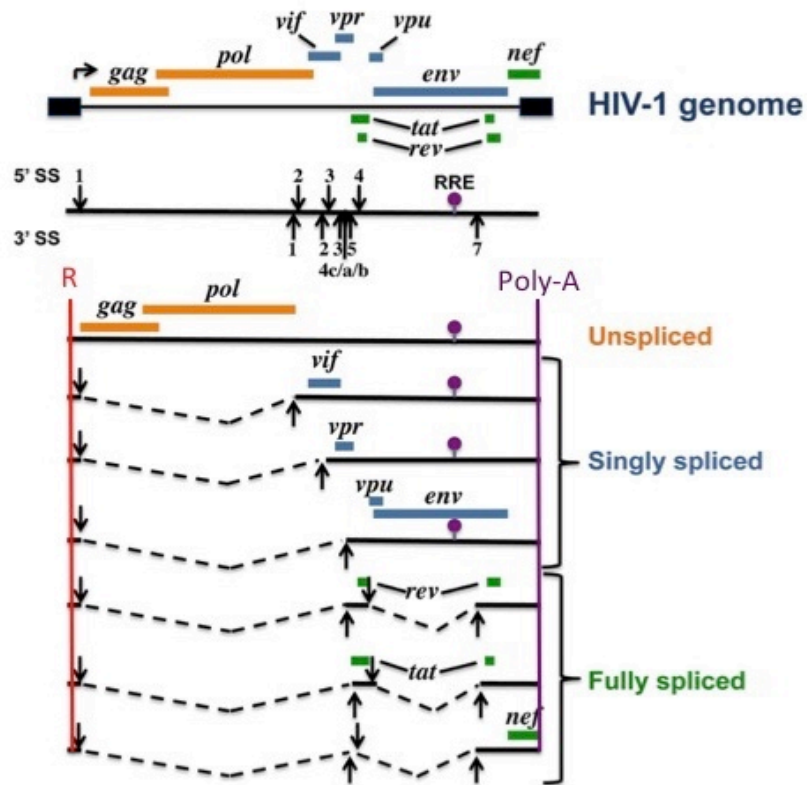


Figure 12. Représentation schématique des différents transcrits du VIH. Les lignes rouges et mauves représentent la localisation des régions R et Poly-A sur les transcrits respectivement. Modifiée de (Mahiet and Swanson 2016)

1.6 Hypothèses

1. Différents blocages transcriptionnels sont responsables de la latence du VIH dans les lymphocytes T CD4⁺.

2. Ces blocages sont différents entre les sous-populations cellulaires de lymphocytes T CD4⁺ mémoires

1.7 Objectifs

Notre but est de mettre au point des techniques de RT-PCR quantitatives pour :

a. Déterminer le profil transcriptionnel au sein de lymphocytes T CD4⁺ totales et ses sous-populations mémoires

b. Évaluer l'efficacité de différents agents pharmacologiques dans leur capacité à forcer la réactivation transcriptionnelle.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1 Participants à l'étude et considérations éthiques

Vingt-deux individus infectés par le VIH, sous thérapie antirétrovirale depuis au moins 2,5 ans et ayant une charge virale inférieure à 50 copies d'ARN du VIH/mL de plasma ont participé à l'étude. Cette participation consiste en une procédure de leucaphérèse afin de recueillir un grand nombre de PBMCs. Les 22 participants ont signé un consentement éclairé (16 à Montréal et 6 en Floride, participants CHO et ST respectivement) et le protocole de recherche a été approuvé par le comité d'éthique du CHUM. Les caractéristiques cliniques des participants sont indiquées dans le tableau 2.

ID	Age (années)	Sexe	Ratio CD4/CD8	Charge virale (copies/mL)	Temps avant initiation du traitement (années)	Temps d'infection (années)	Temps sous thérapie (années)
CHO-HIV1	35	H	1.0	< 40	0.8	8.0	7.1
CHO-HIV3	50	H	0.7	< 40	1.7	20.0	18.3
CHO-HIV5	55	H	0.7	< 40	6.0	15.4	9.4
CHO-HIV7	45	H	0.8	< 40	10.7	14.0	3.3
CHO-HIV9	36	H	0.5	< 40	0.5	7.0	6.6
CHO-HIV11	60	H	1.1	< 40	0.4	4.6	4.3
CHO-HIV17	48	H	1.0	< 40	0.2	16.9	16.7
CHO-HIV18	36	H	0.7	< 40	4.7	13.8	9.1
CHO-HIV20	55	H	1.4	< 40	15.1	29.3	14.1
CHO-HIV28	58	H	1.0	< 40	0.9	21.6	20.7
CHO-HIV31	56	H	1.4	< 40	1.4	11.7	10.3
CHO-HIV32	47	H	1.2	< 40	0.3	15.1	14.8
CHO-HIV34	36	H	1.5	< 40	7.8	12.0	4.2
CHO-HIV36	45	H	0.6	< 40	1.1	13.4	12.3
CHO-HIV37	58	H	2.1	35.0	0.8	9.2	8.4
CHO-HIV38	57	H	1.0	< 20	0.6	20.7	20.1
ST105C	57	H	0.6	< 48	x	x	x
ST114	40	H	0.8	< 20	0.4	6.2	5.9
ST116	47	H	0.8	< 20	2.6	9.4	6.8
ST120	48	H	0.9	< 20	6.0	15.4	9.4
ST135	32	H	1.0	< 20	4.9	7.4	2.5
ST140	36	H	1.3	< 20	x	x	x
Mediane	47.5	N.A	1.0	N.A	1.2	13.6	9.3
Ecart IQ	[37-56]	N.A	[0.8-1.2]	N.A	[0.5-5.2]	[8.9-15.8]	[6.4-14.3]

¹F = Femme, H = Homme

²Le temps d'infection a été calculé à partir du moment du diagnostic

³N.A = Non applicable

x=Données non disponibles

Tableau 2. Caractéristiques des individus infectés par le VIH sous thérapie antirétrovirale

2.2 Génération d'oligonucléotides/sondes et technique de RT-PCR nichée

Nous avons généré des oligonucléotides et sondes de PCR nichée en choisissant les régions les plus conservées possible dans les gènes d'intérêt. Pour ce faire, nous avons réalisé des alignements de séquences provenant de la base de données de Los Alamos en utilisant le site web suivant : <https://www.hiv.lanl.gov/content/index>. Certains oligonucléotides et sondes ont été adaptés de séquences déjà publiées (voir tableau 3). Les oligonucléotides ont été générés par la compagnie *Integrated DNA Technologies*. Les détails des oligonucléotides et sondes concernant les localisations sur le génome du VIH-1, ainsi que le stade de transcription qu'elles représentent sont indiqués dans le tableau 3. Nous avons utilisé une technique de RT-PCR nichée pour améliorer la sensibilité et la spécificité de la quantification absolue (Haff 1994). Les étapes de transcription inverse et de Pre-PCR ont été faites en une étape sur la *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems). Les échantillons ont été analysés en duplicata dans une plaque PCR de 96 puits (Sarstedt, Cat#72.1978.202) et chaque réaction de 25µL de Pre RT-PCR était composée de 12,5µL de *2x Reaction Mix* (Invitrogen, Cat#52202), 1µL de *Superscript/Taq Mix* (Invitrogen, Cat#52122), 500nM d'oligonucléotides, 2,75µL d'eau purifiée (Wisent, Cat#809-115-C) et 8,5µL d'ARN extrait provenant des échantillons. Les standards ARN ont été dilués pour atteindre 6 dilutions (300 000 jusqu'à 3 copies) pour permettre une quantification absolue. Le programme d'amplification pour la Pre-PCR était comme suit : 1) Transcription inverse (50°C-30 min), 2) Dénaturation (95°C-2 min), 3) Cycle d'amplification (94°C-15 sec, 55°C-30 sec, 68°C-1min) 16x, 4) Élongation (65°C-5min), 5) Stabilité (4°C- ∞).

La qPCR nichée a été faite sur un *RotorGene* (Qiagen) dans un volume de réaction de 20µL contenant 13,6µL de *Perfecta qPCR Fast Mix II Low Rox* (QuantaBio, Cat#95120),

6,4µL de l'échantillon amplifié en Pre-PCR (dilué 10x), 1250nM d'oligonucléotides et 100nM de sonde. Le programme d'amplification pour la qPCR nichée était comme suit : 1) Dénaturation (95°C-4min), 2) Cycle d'amplification (95°C-3min, 60°C-10sec) 45x. Les quantités mesurées de chaque transcrit dans ces échantillons ont été calculées à partir des standards ARN, et normalisées par million de lymphocytes T CD4⁺ en fonction des comptes cellulaires réalisés avant l'extraction d'ARN (Ex : 400 copies d'ARN R mesurées par notre standard dans un échantillon de PCR provenant d'ARN extrait de 20 000 T CD4⁺. Donc $400 \times 1\,000\,000 / 20\,000 = 20\,000$ copies d'ARN R/million de lymphocytes T CD4⁺). Des contrôles négatifs composés d'eau ont été ajoutés dans chaque réaction de PCR pour contrôler pour une éventuelle contamination dans la Pre RT-PCR ou la qPCR nichée.

Nom	Utilité	Position sur le VIH HXB2	Séquence (5'-3')	Stade de transcription	Nature du transcrit
R-S1	Sens1 R	456→473	GTCTCTCTRGTTAGACCA	Elongation proximale	R
R-S2	Sens2 R	474→489	GATCWGAGCCTGGGAG		
R-AS	Antisens1 et 2 R	514←535	AGCTTTATTGAGGCTTAAGCAG		
R-Sonde	Sonde R	492→513	/56-FAM/CTCTGGCTA/ZEN/ACTAGGGAACCCA/3IABkFQ/		
Pol-S*	Sens1 et 2 Pol	4809→4829	TACAGTGCAGGGGAAAGAATA	Elongation distale	Pol
Pol-AS1	Antisens 1 Pol	4993←5017	CTTCTTGCCACTACTTTTATGTCAC		
Pol-AS2*	Antisens 2 Pol	4957←4974	CTGCCCTTCACCTTCC		
Pol-Sonde*	Sonde Pol	4896→4921	/56-FAM/TTTCGGGT/ZEN/TATTACAGGGACAGCAG/3IABkFQ/		
Poly-A-S1**	Sens1 Poly-A	9501→9523	CAGATGCTGCATATAAGCAGCTG	Maturation des transcrits	Poly-A
Poly-A-S2	Sens2 Poly-A	9531→9550	CCTGTACTGGGTCTCTCTGG		
Poly-A-AS**	Antisens1 et 2 Poly-A	9630←9638	TTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAGCACTC		
Poly-A-Sonde**	Sonde Poly-A	9583→9602	/56-FAM/CTRRCTAGG/ZEN/GAACCCACTGC/3IABkFQ/		
Tat-S1***	Sens1 Tat-Rev	5971→5989	TGGCAGGAAGAAGCGGAGA	Poly-Epissage	Tat-Rev
Tat-S2***	Sens2 Tat-Rev	6012→6045	ACAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCA		
Tat-AS***	Antisens1 et 2 Tat-Rev	8433←8459	GGATCTGTCTCTGTCTCTCTCTCCACC		
Tat-Sonde***	Sonde Tat-Rev	8399←8421	/56-FAM/TTCTTCGG/ZEN/GCCTGTCGGGTCCC/3IABkFQ/		

*Rousseau *et al* 2004

**Shan, L. *et al* 2013

***Procopio *et al.* 2015

Tableau 3. Propriétés des oligonucléotides et sondes

2.3 Génération des standards ARN

2.3.1 Transformation bactérienne avec le plasmide d'intérêt, maxiprep, amplification et purification de l'ADN M13

Nous avons fait synthétiser des constructions de plasmides contenant nos gènes d'intérêts (les régions codantes pour les standards ARN) chez *Integrated DNA Technologies*, à l'exception du plasmide codant pour le standard Tat-Rev qui a été offert par la Dre Deanna Kulpa (Emory University). Dans chaque plasmide était contenu le gène d'intérêt, un promoteur T7, flanqué de deux régions M13 (-20) et M13 (-27). Nous avons transformé des bactéries TOP 10 (ThermoFisher, Cat#C404003) selon le protocole fourni et avons par la suite récolté et purifié le plasmide amplifié en procédant à une maxiprep, suivant un protocole recommandé (Qiagen, Cat# 51306). Nous avons par la suite amplifié par PCR la séquence d'intérêt en utilisant les oligonucléotides M13 (Sens -20 : 5' - GTAAAACGACGGCCAG-3'; Antisens -27: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3', *Integrated DNA Technologies*) pour obtenir des fragments linéaires (M13) contenant le promoteur T7 ainsi que la séquence d'intérêt. Finalement, nous avons purifié l'ADN M13 amplifié selon un kit de purification d'ADN (Qiagen, Cat#51306).

2.3.2 Transcription *in vitro*, mesure de taille et de concentration des ARN nouvellement transcrits

Nous avons généré nos standards ARN par transcription *in vitro* (6h à 37 °C) provenant des ADN M13 linéaires générés par PCR à partir du *Riboprobe-System T7* (Promega, Cat#P1440). Nous avons par la suite digéré l'ADN M13 restant avec un traitement DNase (Promega, Cat# M6101) de 15 minutes à 37 degrés Celsius fourni par le Kit. L'ARN nouvellement synthétisé a ensuite été purifié sur colonne dans un éluat d'eau sans RNases en utilisant le *RNeasy Mini Kit (250)* (Qiagen, Cat#74106). Nous avons par la suite dilués nos standards ARN *in vitro* dans de l'ARN extrait provenant de PBMCs d'individus VIH négatifs afin d'augmenter la concentration de nos échantillons à 200ng/μL et améliorer les conditions de conservation (Olivieri et al. 2014). Pour mesurer la taille et la concentration des transcrits, nous avons analysé nos échantillons au *Aligen Bioanalyser 6000 Pico Kit* (Aligen, Cat#5067-1514). Nous avons calculé le nombre de copies d'ARN présent dans nos échantillons grâce à ces informations en utilisant l'outil suivant : <http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php>

2.4 Enrichissement et culture de lymphocytes T CD4+

Afin d'obtenir une population d'intérêt, les lymphocytes T CD4⁺ ont été enrichis à partir d'environ 50-100 millions de PBMCs (eux-mêmes obtenus à partir d'une centrifugation par gradient de Ficoll (StemCell, Cat#07851)) par sélection négative par billes à partir d'un kit d'enrichissement (Stemcell, Cat#19052). Les T CD4⁺ ont ensuite été mis en culture à environ 2 millions de cellules par puits de plaque-24 puits (BD Falcon, Cat#353047) dans du RPMI 1640 (Life Technologies, Cat 11875-093) contenant 10% de FBS (Wisent, Cat# 080-150), 1X

de Pénicilline et Streptomycine (Life Technologies, Cat#15070-063) et 1X d'un cocktail d'antirétroviraux (3TC [c]=200nM et RAL [c]=200nM). Les ARV ont été inclus pour empêcher le cycle de réplication viral et donc l'infection de cellules avoisinantes dans la culture cellulaire. Les ARV ont été obtenus à travers le « AIDS reagent program <https://www.aidsreagent.org/index.cfm>. Les cellules sont restées au repos pour une période de 2h avant stimulation.

2.5 Stimulation des lymphocytes T CD4⁺

Pour étudier l'impact de différents composés pharmacologiques sur la réactivation transcriptionnelle, les lymphocytes T CD4⁺ en culture à concentration de 2×10^6 cellules/mL ont été stimulés 18 ou 24h (après 2h de repos) par les composés suivants : 1) PMA (100ng/mL) + ionomycine (1μg/mL), 2) JQ-1 (10μM), 3) Panobinostat (Pano, 5nM ou 100nM), 4) Romidepsine (Romi, 10nM), 5) Bryostatine (Bryo, 25nM), 6) Ingénol (Ing, 25nM ou 500nM), 7) Panobinostat (Pano, 100nM) + JQ-1 (10μM) + Ingénol (Ing, 500nM), 8) Panobinostat (Pano, 100nM) + Ingénol (Ing, 500nM). Les contrôles DMSO (0,1%) et RPMI étaient inclus. Les viabilités et comptes cellulaires ont été faits juste avant l'étape d'extraction pour assurer un comptage précis.

2.6 Contrôle de pureté et d'activation

Pour nous assurer de l'efficacité et la pureté de l'enrichissement en lymphocytes T CD4⁺, ainsi que de leur activation, nous avons analysé environ 200 000 cellules des puits de

culture dans les conditions non stimulées et les conditions stimulées après les 18-24h de culture par cytométrie en flux (Figure 13). Nous avons fixé nos cellules avec du PBS contenant du FA (2%) avec les fluorochrome couplés aux anticorps suivant : Alexa Fluor 700/CD3 (BDbioscience, Cat#557943), APC/CD4 (BDbioscience, Cat#555349), PerCPCy5.5-CD8 (BDbioscience, Cat#560662), V450/CD14 (BDbioscience, Cat#560349), Pe/Cy7 (Biolegend, Cat#310912), AmCyan-Live/Dead (Life Technologies, Cat#L34957). Nous avons donc contrôlé pour la viabilité cellulaire (Vivid), l'activation (CD69), les contaminations en monocytes (CD14) et lymphocytes T $CD8^+$ (CD8) et la pureté des lymphocytes T $CD4^+$ (CD4). La diminution de l'expression du CD4 ainsi que l'augmentation de l'expression du CD69 attestent de l'activation des lymphocytes T $CD4^+$.

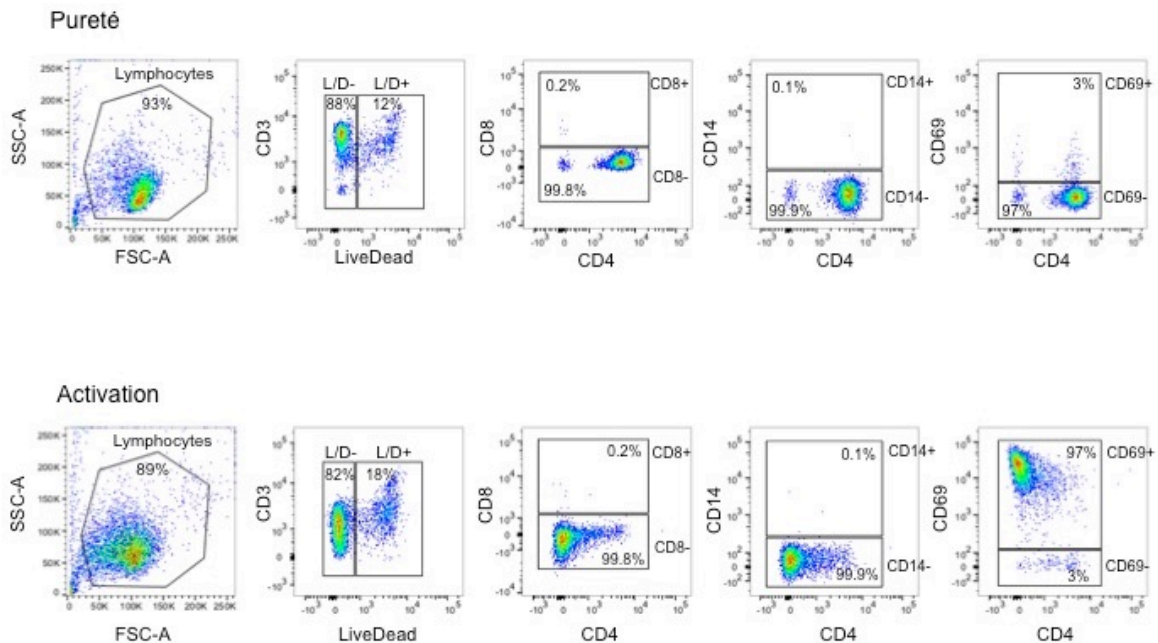


Figure 13. Contrôle de pureté et d'activation. Les lymphocytes T $CD4^+$ purifiés **A)** non stimulés et **B)** stimulés 18h avec la PMA (100ng/mL) et la ionomycine (1 μ g/ml) ont été analysés en cytométrie de flux pour déterminer la qualité de la purification ainsi que de l'activation.

2.7 Extraction d'ARN

Pour obtenir le profil transcriptionnel des lymphocytes T CD4⁺ enrichis, les ARN des lymphocytes en culture (comptés juste avant l'extraction) ont été lysés dans du tampon RLT contenant du beta mercaptoethanol (10µl/mL de RLT) puis ont été extraits sur colonne avec le *RNeasy Mini Kit* (250) (Qiagen, Cat#74106) en suivant le protocole fourni par le manufacturier. Une étape de traitement DNase sur colonne (Qiagen, Cat#79254) de 15 minutes à température ambiante a été incluse pour éliminer l'ADN proviral potentiellement contaminant et augmenter la pureté de notre extraction. Les ARN ont été élués dans de l'eau ultra pure fournie par la compagnie et ont été stockés à -80°C.

Une méthode d'extraction organique avec phénol a été utilisée sur certains échantillons (Cercles sur les figures 24, 25 et 26) en suivant le protocole fourni par le *mirVana miRNA Isolation Kit, with phenol* (ThermoFisher, Cat#AM1560). Les ARN extraits ont été élués dans de l'eau ultra pure et ont été stockés à -80°C. Un traitement DNase a été réalisé juste avant la réaction de RT-PCR avec la *DNase I, Amplification Grade* (ThermoFisher, Cat#18068015) pendant 15 minutes à 37°C, puis inactivée 10 min à 65°C, afin d'éliminer un maximum de signal contaminant.

2.8 Stratégie de tri pour les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires

Afin d'établir le profil transcriptionnel au sein de différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires, nous avons utilisé la cytométrie de flux pour trier environ 10

millions de lymphocytes T $CD4^+$ avant extraction des ARN (Figure 14). Nous avons utilisé les fluorochromes couplés aux anticorps suivant: FITC/CD3 (BDbioscience, Cat#555339), APC/CD4 (BDbioscience, Cat#555349), Amcyan-Live/Dead (Life Technologies, Cat#L34957), APC-H7/CD45-RA (BDbioscience, Cat#560674), PeCy7/CCR7 (BDbioscience, Cat#557648) et PE/CD27 (BDbioscience, Cat#555441). Nous avons obtenu des populations T $CD4^+$ naïves, T $CD4^+$ centrales mémoires, T $CD4^+$ transitionnelles mémoires et T $CD4^+$ effectrices mémoires ($CD45RA^+/CCR7^+/CD27^+$, $CD45RA^-/CCR7^+/CD27^+$, $CD45RA^-/CCR7^-/CD27^+$, $CD45RA^+/CCR7^-/CD27^-$ respectivement).

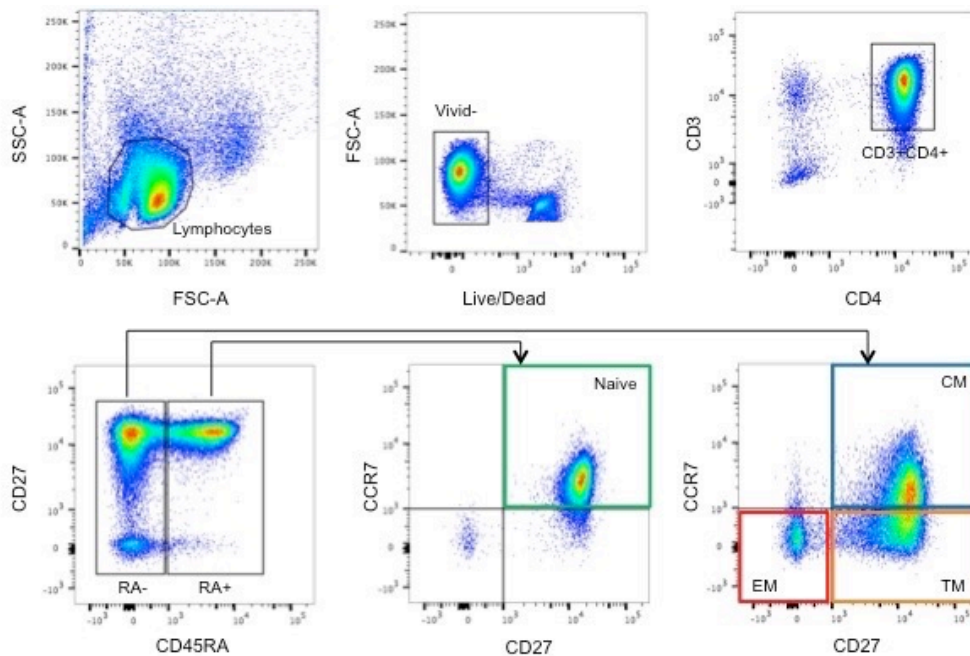


Figure 14. Stratégie de tri des sous-populations de lymphocytes T $CD4^+$ mémoires par cytométrie de flux. Les lymphocytes T $CD4^+$ mémoires naïfs ont été définis par fenêtre $CD45RA^+$ puis $CD27^+/CCR7^+$ (encadré vert). Les lymphocytes T $CD4^+$ mémoires centrales, transitionnelles et effectrices ont été triés par une fenêtre $CD45RA^-$, puis $CCR7^+/CD27^+$ (encadré bleu), $CCR7^-/CD27^+$ (encadré orange) et $CCR7^-/CD27^-$ (encadré rouge) respectivement.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Mise au point des techniques de RT-PCR ultrasensibles

Pour être capable de déterminer les différentes proportions de transcrits du VIH au sein de lymphocytes T CD4⁺ de façon robuste, sensible et quantitative, nous avons mis au point une technique de RT-PCR nichée quantitative. Pour accomplir cela, certaines étapes de validations ont été nécessaires pour établir la fiabilité de notre technique.

3.1.1 Élaboration et vérification des oligonucléotides

Afin de pouvoir analyser le profil transcriptionnel de cellules T CD4⁺ infectées provenant d'individus vivant avec le VIH, nous avons mis au point une série d'oligonucléotides et de sondes fluorescentes pouvant être utilisés pour mesurer des transcrits de différentes natures dans des cellules infectées par le VIH par la technique de RT-PCR nichée en temps réel. Certains de ces oligonucléotides et sondes ont été élaborés par notre laboratoire. Nous avons également utilisé des séquences provenant d'études déjà publiées (Procopio et al. 2015) (Rousseau et al. 2004) (Shan et al. 2013).

Nous avons vérifié que les séquences d'oligonucléotides reconnaissaient efficacement les transcrits produits par le VIH dans des cellules provenant d'individus infectés par le VIH sous thérapie antirétrovirale. Pour ce faire, nous avons extrait l'ARN provenant d'environ 3 millions de lymphocytes T CD4⁺ obtenus de 8 individus et stimulés par PMA (100ng/mL) et ionomycine (1µg/mL) pendant 18 heures et avons utilisé ces oligonucléotides pour déterminer si nous détectons un signal dans un total d'environ 280 000 équivalents cellules par réaction

de RT-PCR. Comme la figure 15 l'indique, nous avons détecté, pour chaque type de transcrit et pour la majorité des échantillons testés, un signal de RT-PCR clair et distinct du bruit de fond et suivant une courbe d'amplification traditionnelle. Il est à noter que pour certains types de transcrits comme poly-A et Tat-Rev, certains échantillons présentent des courbes sous-optimales comparativement à une courbe classique d'amplification. Nous avons également validé que ces oligonucléotides étaient spécifiques au VIH et ne génèrent aucun signal sur un échantillon provenant d'un individu non infecté par le VIH. Ces oligonucléotides et ces sondes sont donc spécifiques du VIH et n'amplifient pas de séquences dans des échantillons provenant de personnes non infectées le VIH.

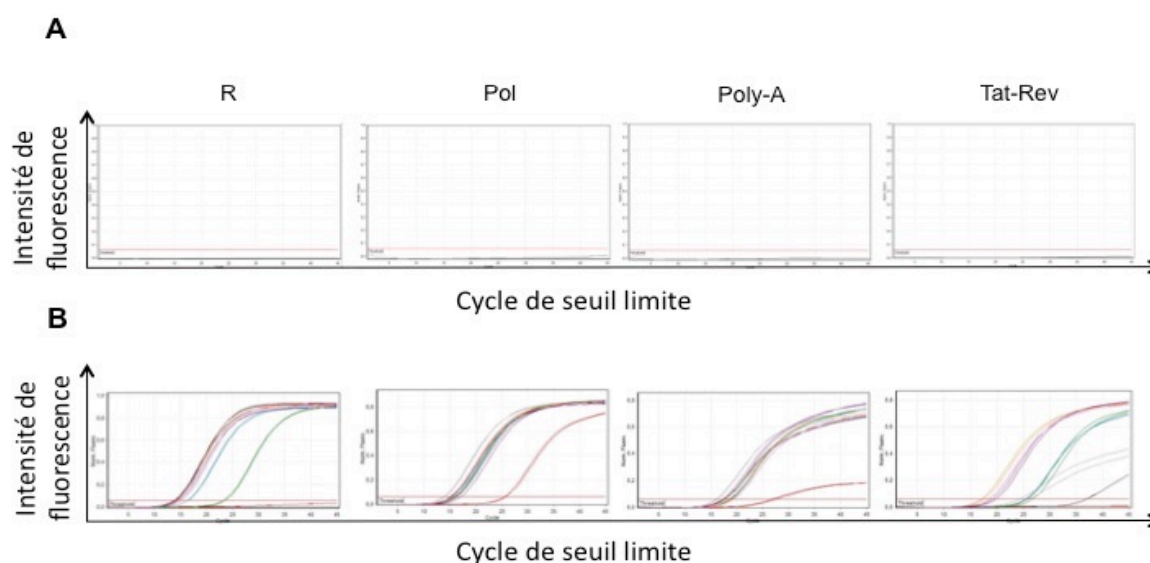


Figure 15. Les oligonucléotides développés sont spécifiques au VIH et capables de détecter efficacement les ARN cibles chez les individus infectés par le VIH. Les paires d'oligonucléotides ont été testées sur l'ARN extrait de lymphocytes T CD4⁺ stimulés pendant 18h par la PMA (100ng/mL) et la ionomycine (1µg/mL). A) Échantillon provenant d'un individu non infecté par le VIH. B) Échantillons provenant de 8 individus infectés par le VIH sous thérapie antirétrovirale. Les individus sont représentés par différentes couleurs, en duplicata.

3.1.2 Génération des standards par transcription *in vitro*

Afin de pouvoir réaliser des RT-PCR quantitatives, nous avons développé un standard référence pour chaque transcrit mesuré. Nous avons généré ces standards en utilisant une technique de transcription *in vitro* permettant de produire de grandes quantités de transcrits cibles à partir d'un plasmide. Suivant la transcription *in vitro*, nous avons dilué les ARN cibles dans des ARN provenant de cellules d'individus non infectés par le VIH pour augmenter la concentration d'ARN total, et ainsi améliorer leur capacité de conservation dans le temps. Nous avons analysé les échantillons de transcrits *in vitro* au *Bioanalyser* (Figure 16). Nous avons ainsi mesuré la taille et la concentration des transcrits respectifs et avons ainsi pu calculer le nombre de copies présentes par unité de volume.

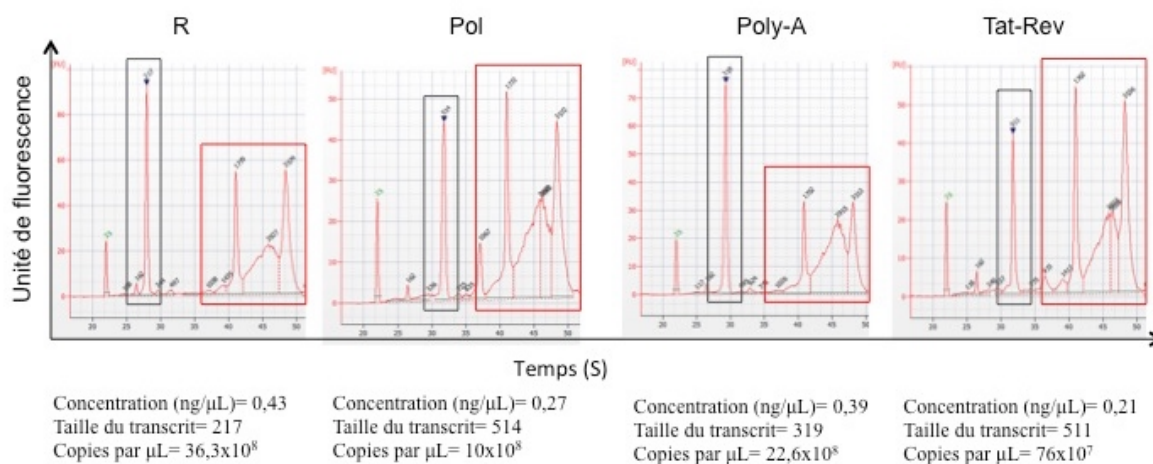


Figure 16. Contrôle de qualité des transcrits générés *in vitro*. Les transcrits ont été évalués au *Bioanalyser* afin de contrôler leurs, tailles et concentrations après transcription *in vitro*. Les rectangles noirs représentent les pics de chacun des standards ARN (R, Pol, Poly-A et Tat-rev) et les rectangles rouges représentent l'ARN provenant de donneurs non infectés par le VIH dans lequel les ARN d'intérêts ont été dilués afin d'augmenter leur concentration. Les multiples pics d'ARN dans les rectangles rouges représentent tous les différents transcrits produits au sein des cellules et ne contiennent pas l'ARN du standard.

3.1.3 Mise au point des standards ARN

À la suite de la synthèse des standards ARN produits par transcription *in vitro*, nous avons souhaité déterminer si nous obtenions des courbes standards de bonne qualité pour faire nos mesures quantitatives. Nous avons donc dilué en série (1 :10), chacun de nos standards pour avoir 6 points de dilutions, soit de 300 000 copies à 3 copies. Nous avons obtenu des courbes standard montrant de bonnes efficacités pour tous les transcrits (R, Pol, Poly-A, Tat-Rev), soit 105,4 %, 97,3%, 97,2% et 90,8% respectivement. Les coefficients de corrélation pour les courbes standard étaient tous supérieurs à 0,99 (Figure 17). Ces standards de quantification étaient donc considérés appropriés pour leur utilisation à des fins de quantification absolue.

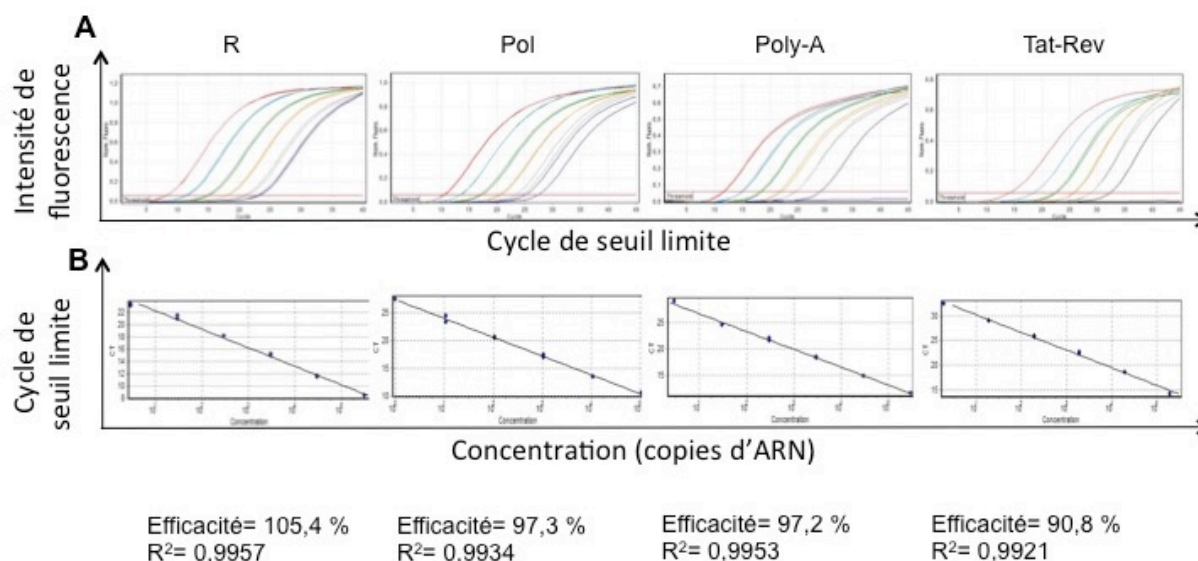


Figure 17. Courbes standards générées par transcription *in vitro*. Six points de dilutions en série (1:10) ont été utilisés pour établir les courbes standards (3×10^6 copies jusqu'à 3 copies en duplicata). Les calculs d'efficacité et de coefficients de régression linéaire représentent la moyenne de 5 courbes standards. **A)** Courbes d'amplifications, **B)** Courbes standards

3.1.4 Détermination de la sensibilité de la technique

Afin de déterminer la sensibilité de nos méthodes, nous avons utilisé une technique de dilution limite. La RT-PCR a été faite sur 3 dilutions en séries (30, 3, 0,3 copies) issues de 7 répliquas pour chacun de nos standards. Nous avons déterminé la valeur estimée de la sensibilité de notre technique (calculée par l'algorithme ELDA (Hu and Smyth 2009)) pour le transcrit R= 4,5 copies, avec une limite supérieure de 1,2 et une limite inférieure de 10,5. Pour Pol= 5,7 copies avec une limite supérieure de 2,2 et inférieure de 14,9 ont été observées. Le transcrit Poly-A=10,4 copies, avec une limite supérieure de 4,4 et une limite inférieure de 23,4. Finalement, nous avons mesuré une sensibilité de 5,1 copies, avec une limite supérieure de 2,2 et inférieure de 11,1 pour le transcrit Tat-Rev (Figure 18). Ainsi, malgré quelques variations, les sensibilités pour nos différents transcrits étaient relativement similaires, avec une sensibilité toutefois environ deux fois inférieure pour les transcrits Poly-A. Nous avons donc généré des standards sensibles et de bonnes efficacités pour chacun des transcrits d'intérêt.

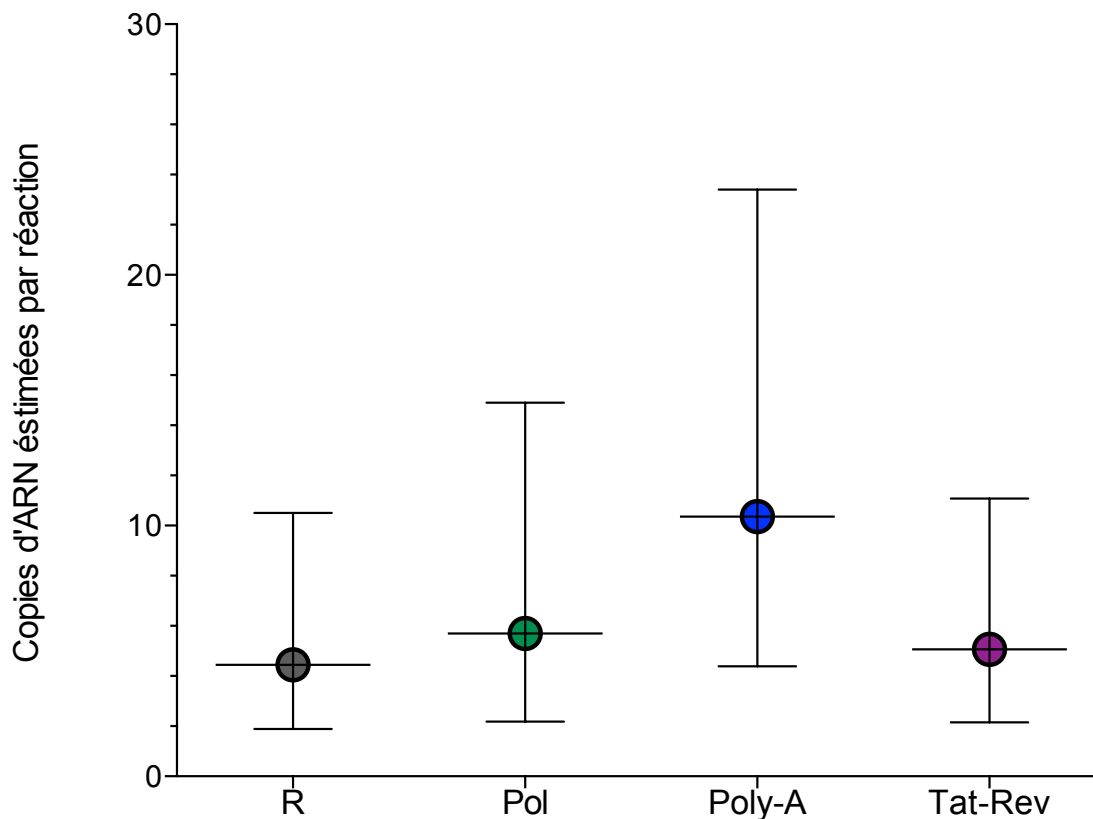


Figure 18. La technique de RT-PCR est sensible pour chacun des transcrits mesurés. La RT-PCR a été faite sur 3 dilutions en séries (30, 3, 0,3 copies) issues de 7 répliquats sur les standards R, Pol, Poly-A et Tat-rev. La figure présente la valeur médiane de la sensibilité de la technique calculée par l'algorithme ELDA. Les marges supérieures et inférieures sont indiquées.

3.2 Modulation du profil transcriptionnel de lymphocytes T CD4⁺ après activation par la PMA-ionomycine

Afin de déterminer l'impact d'une stimulation par la PMA-ionomycine sur le profil de réactivation transcriptionnelle du VIH au sein de lymphocytes T CD4⁺ totaux, nous avons utilisé notre technique de RT-PCR pour mesurer de manière quantitative les différentes formes de transcrits du VIH présent dans cette population avant et après stimulation.

3.2.1 Contrôle de pureté et d'activation des lymphocytes T CD4⁺

Après l'enrichissement en T CD4⁺ et à la stimulation par PMA et ionomycine, il était important de contrôler pour différents facteurs, telle la viabilité cellulaire, la pureté ainsi que le niveau d'activation. Ainsi, nous avons analysé environ 100 000 cellules en cytométrie de flux et avons contrôlé pour la viabilité cellulaire avant et après stimulation. Nous montrons dans la figure 13 le profil de ces différents facteurs pour un échantillon représentatif. Nous avons mesuré une viabilité cellulaire d'environ 87,6% et 82% pour les conditions stimulées et non stimulées respectivement. Nous avons ensuite contrôlé pour la contamination potentielle en lymphocytes T CD8⁺. Celle-ci était négligeable avec environ 0,19% de lymphocytes T CD8⁺ et 99,8% de T CD4⁺ dans la condition non stimulée et 0,16% dans la condition stimulée. Nous avons mesuré une proportion de monocytes négligeable dans les deux conditions soit 0,10% (non stimulées) et 0,076% (stimulées), mesurée par le marqueur CD14. Finalement, nous avons contrôlé pour la qualité de la stimulation par le marqueur CD69 et le marqueur CD4 en parallèle et avons mesuré un pourcentage d'activation d'environ 2,69% dans la condition non stimulée et 97,1% dans la condition stimulée. Nous avons donc déterminé que nos conditions expérimentales ne souffraient pas de contaminations et induisaient des niveaux de stimulation élevées.

3.2.2 Profil au sein de lymphocytes non stimulés

Nous avons établi les profils transcriptionnels de lymphocytes T CD4⁺ totaux provenant de 14 individus infectés par le VIH et sous thérapie antirétrovirale, afin de déterminer si certains types de transcrits étaient plus exprimés que d'autre, et dans quelles

proportions. Notre objectif était d'identifier des étapes potentiellement limitantes dans le processus de transcription.

L'ARN de 3 millions de lymphocytes T CD4⁺ a été extrait et nous avons mesuré par RT-PCR les quantités absolues des différents transcrits produits pendant les 18h de culture. Les transcrits de type R, soit les transcrits d'initiation de l'élongation proximale, semblent être en plus grande proportion comparativement aux transcrits Pol, Poly-A et Tat-Rev (Médiane=619, 213, 160, 18 copies/million de T CD4⁺ respectivement. $p=0,0052$ pour R vs Pol et R vs Poly-A; $p=0,0134$ pour R vs Tat-Rev). En revanche, nous n'avons pas observé de différence significative entre la quantité absolue de transcrits Pol et celle de transcrits Poly-A. Enfin, nous n'avons pas mesuré de différences significatives entre les quantités de transcrits mesurées pour Tat-Rev comparativement aux quantités mesurées pour Pol et Poly-A (Figure 19-A).

Nous avons ensuite normalisé les quantités d'ARN mesurées dans les lymphocytes T CD4⁺ totaux par les valeurs d'ADN intégré (ADN proviral) au sein des différents échantillons pour évaluer la quantité de transcrits produits par unité provirale et ainsi tenir compte des différences dans les fréquences de lymphocytes contenant de l'ADN proviral au sein de nos échantillons. Nous avons observé une plus grande proportion de transcrits R que de transcrits Pol, Poly-A et Tat-Rev par unité provirale (Médiane=1,5, 0,6, 0,7, 0,06 copies/unité provirale respectivement. $p=0,0052$ pour R vs Pol; $p=0,0134$ pour R vs Poly-A; $p=0,0085$ pour R vs Tat-Rev) (Figure 19-D). Nous n'avons pas observé de différence significative en comparant les autres transcrits entre eux. Nous avons noté une proportion de transcrits Pol, Poly-A et Tat-Rev plus faible que les transcrits R au sein de lymphocytes T CD4⁺ non stimulés. Nos résultats suggèrent qu'au sein de cellules latentes, il y ait un profil transcriptionnel contenant une

prépondérance d'évènements d'initiation de l'élongation (R). En contrepartie, nos résultats indiquent une proportion moindre de transcrits d'élongation distale (P), de maturation (Poly-A) et encore moindre de transcrits polyépissés, reflétant potentiellement des blocages transcriptionnels à ces niveaux.

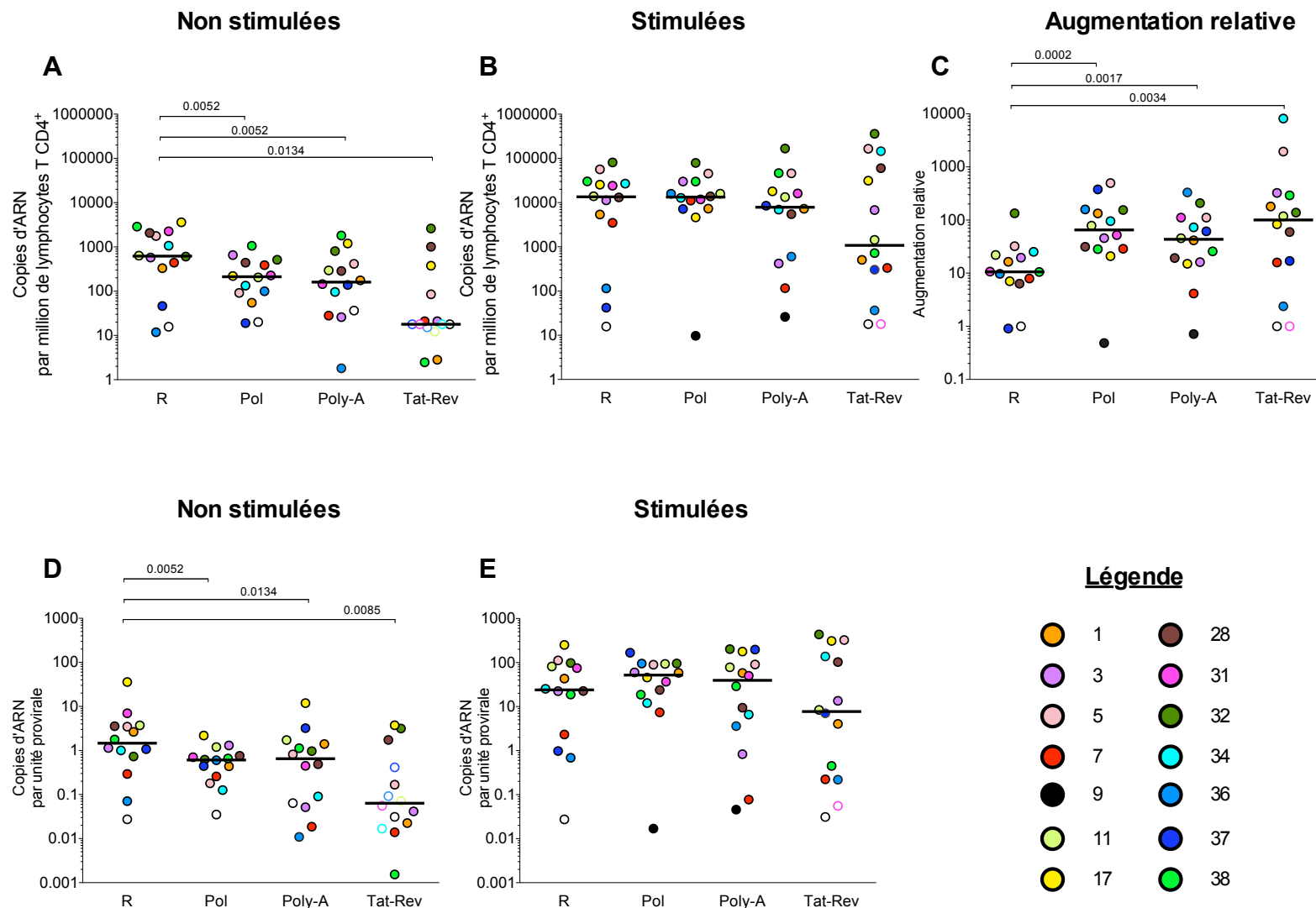


Figure 19. L'activation par la PMA-ionomycine augmente l'élongation, la maturation et le polyépissage des transcrits du VIH Les lymphocytes T CD4⁺ purifiées de 14 individus infectés par le VIH sous thérapie antirétrovirale ont été stimulés pendant 18h avec la PMA (100ng/mL) et la ionomycine (1µg/ml). **A)** Profil transcriptionnel normalisé par million de cellules non stimulées. **B)** Profil transcriptionnel normalisé par million de cellules stimulées. **C)** Augmentation relative du profil transcriptionnel entre les cellules stimulées et les cellules non stimulées. **D)** Profil transcriptionnel de cellules non stimulées normalisé par unité provirale. **E)** Profil transcriptionnel de cellules stimulées normalisé par unité provirale. Les symboles vides représentent la limite de détection pour chaque individu. La médiane est représentée et les test-t non paramétriques de Wilcoxon ont été utilisés pour les tests statistiques. La légende représente les numéros d'échantillons des individus à l'étude.

3.2.3 Profil au sein de lymphocytes stimulés par PMA-ionomycine

Nous avons par la suite évalué l'impact d'une stimulation (18h) par la PMA (100ng/mL) + ionomycine (1µg/mL) sur le profil transcriptionnel des lymphocytes T CD4⁺. En activant ainsi les cellules, nous testons l'hypothèse d'une augmentation significative de la transcription du VIH en général, mais aussi des augmentations de différentes intensités en fonction des types de transcrits analysés, reflétant potentiellement des étapes de transcription plus inductibles que d'autres.

Après stimulation, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les quantités d'ARN R, Pol, Poly-A et Tat-Rev (Médiane=13 524, 13 315, 7 876, 1 079 copies d'ARN/million de lymphocytes T CD4⁺ respectivement) (Figure 19-B). Nous avons noté une forte variation interindividuelle dans les quantités absolues mesurées pour les transcrits Tat-Rev comparativement à R, Pol et Poly-A (σ_x =103 979, 44 034, 23 369 et 20 720 respectivement), pouvant ainsi expliquer pourquoi nous n'avons pas noté pas différences significatives entre R et Tat-Rev. Nous avons normalisé les quantités d'ARN mesurées dans les lymphocytes T CD4⁺ totaux par unité provirale au sein des différents échantillons pour la même raison que décrite en 3.2.2. Même après normalisation, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les différents transcrits mesurés au sein de lymphocytes T CD4⁺ stimulés (Médiane=24, 52, 40, 8 copies ARN/unité provirale pour R, Pol, Poly-A et Tat-Rev respectivement) (Figure 19-E). Il est important de noter les fortes variations interindividuelles pour les quantités de Tat-Rev mesurées. Ces résultats suggèrent qu'après stimulation par la PMA et ionomycine, les différents transcrits mesurés sont tous induits à des niveaux similaires.

Nous avons ensuite mesuré l'augmentation relative de la quantité de chacun des transcrits suite à la stimulation de 18h par la PMA-ionomycine pour identifier les étapes de la transcription qui sont les plus modulées suite à la réactivation (Figure 19-C). Nous avons observé une augmentation relative de la transcription significativement plus élevée pour les transcrits Pol, Poly-A et Tat-Rev comparativement aux transcrits R (Médiane=65,1x, 43,4x, 100,6x et 10,6x respectivement. $p=0,0002$ pour R vs Pol; $p=0,0017$ pour R vs Poly-A; $p=0,0034$ pour R vs Tat-Rev). En revanche, nous n'avons pas noté de différences significatives entre les autres transcrits entre eux ($p=0,2166$ pour Pol et Poly-A; $p=0,2412$ pour Pol et Tat-Rev; $p=0,1726$ pour Poly-A et Tat-Rev). Nous avons ainsi observé une augmentation de la transcription plus forte pour les transcrits Pol, Poly-A et Tat-Rev, comparativement aux transcrits R. Ainsi, l'activation par la PMA et la ionomycine induit une augmentation générale de la transcription du VIH mais a un impact plus prononcé sur les événements d'élongations, de maturation et de polyépissage des transcrits viraux.

3.2.4 Corrélation entre les niveaux de transcrits dans les lymphocytes T CD4⁺ stimulés/non-stimulés et les mesures: 1) d'ADN intégré; 2) de réservoirs compétents à la traduction; 3) de réservoirs infectieux

Afin de déterminer si les méthodes que nous avons développées pouvaient être utilisées comme mesures du réservoir du VIH, nous avons déterminé si la production des différents transcrits d'intérêts corrélait avec différentes techniques de mesure de réservoirs, par exemple la fréquence de cellules possédant de l'ADN proviral (par PCR d'ADN intégrée), la fréquence de cellules exprimant la protéine de capsid P24 (par technique d'HIV FLOW), ainsi que la taille du réservoir infectieux (par Q-VOA=*Quantitative Viral Outgrowth Assay*). Ces études de

corrélations pourraient ainsi nous permettre d'identifier des substituts pour certaines techniques de mesure de réservoirs fonctionnels comme le Q-VOA par exemple, qui est considéré comme la mesure de référence pour déterminer la taille du réservoir compétent à la réplication (Siliciano and Siliciano 2005), mais qui est laborieuse et coûteuse. Un tableau récapitulatif des valeurs de corrélation est présent à la fin de cette section (Tableau 4).

Nous avons observé une corrélation positive significative entre les quantités d'ARN Pol et la fréquence de cellules portant de l'ADN proviral au sein de cellules non stimulées ($R^2 = 0,5648$, $p = 0,0383$) (Figure 20-A). Ainsi, nos résultats suggèrent que l'élongation distale (Pol) des transcrits soit proportionnelle à la quantité d'ADN intégré lorsque les cellules sont à l'état de latence. Bien que la corrélation ne soit pas parfaite, cela suggère que le transcrit Pol pourrait être un marqueur transcriptionnel permettant d'estimer la taille du réservoir intégré. Par ailleurs, nous avons aussi observé une corrélation positive significative entre les quantités d'ARN polyépisé (Tat-Rev) et la fréquence de lymphocytes T $CD4^+$ compétent à la traduction (P24) dans la condition stimulée ($R^2 = 0,5721$, $p = 0,0352$) (Figure 21-B). Les protéines Tat et Rev sont cruciales à l'augmentation de la transcription (Vaishnav and Wong-Staal 1991) et à l'exportation des ARN mono et non épissés vers le cytoplasme (Fernandes, Jayaraman, and Frankel 2012), et par extension sont donc importantes pour la production de protéines virales. Ainsi, la corrélation positive entre la production de protéine P24 et la production d'ARN Tat-Rev suggère que ce transcrit polyépisé pourrait servir de substitut pour évaluer la taille du réservoir compétent à la traduction. Finalement, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre les quantités d'ARN mesurées et la mesure de la taille du réservoir infectieux, mesuré par QVOA. Cela peut être expliqué partiellement par le fait que la transcription est un événement en amont de la production de particules virales infectieuses, et

que beaucoup d'étapes limitantes en aval peuvent limiter la production de virus infectieux, que ce soit mutations, délétions, défauts de maturation de la particule virale, ou autre. (Ho and Siliciano 2015).

	Condition stimulée					
	ADN intégré		P24		UIPM	
Transcrits	R ²	Valeur P	R ²	Valeur P	R ²	Valeur P
R	0,3802	0,1808	0,5121	0,0641	0,2729	0,3332
Pol	0,3846	0,1755	0,2440	0,3998	0,2747	0,3411
Poly-A	0,0241	0,9396	0,2484	0,3911	0,0593	0,8438
Tat-Rev	0,2948	0,3038	0,5721	0,0352	0,2750	0,3383
	Condition non-stimulée					
	ADN intégré		P24		UIPM	
Transcrits	R ²	Valeur P	R ²	Valeur P	R ²	Valeur P
R	0,2352	0,4175	0,2308	0,4265	0,1429	0,6266
Pol	0,5648	0,0383	0,2747	0,3411	0,2220	0,4448
Poly-A	0,0857	0,7732	0,2967	0,3025	0,0857	0,7732
Tat-Rev	0,1533	0,5987	0,2978	0,2991	0,1778	0,5153

Tableau 4. Valeurs des différentes mesures de corrélations entre les quantités d'ARN mesuré par millions de lymphocytes T CD4+ et différentes mesures de réservoirs.

ADN intégré= unités provirales par million de lymphocytes T CD4+; P24= Fréquence de lymphocytes T CD4+ exprimant la protéine P24 par million; UIPM= Unités infectieuses par million de lymphocytes T CD4+). Les rectangles rouges représentent les corrélations statistiquement significatives.

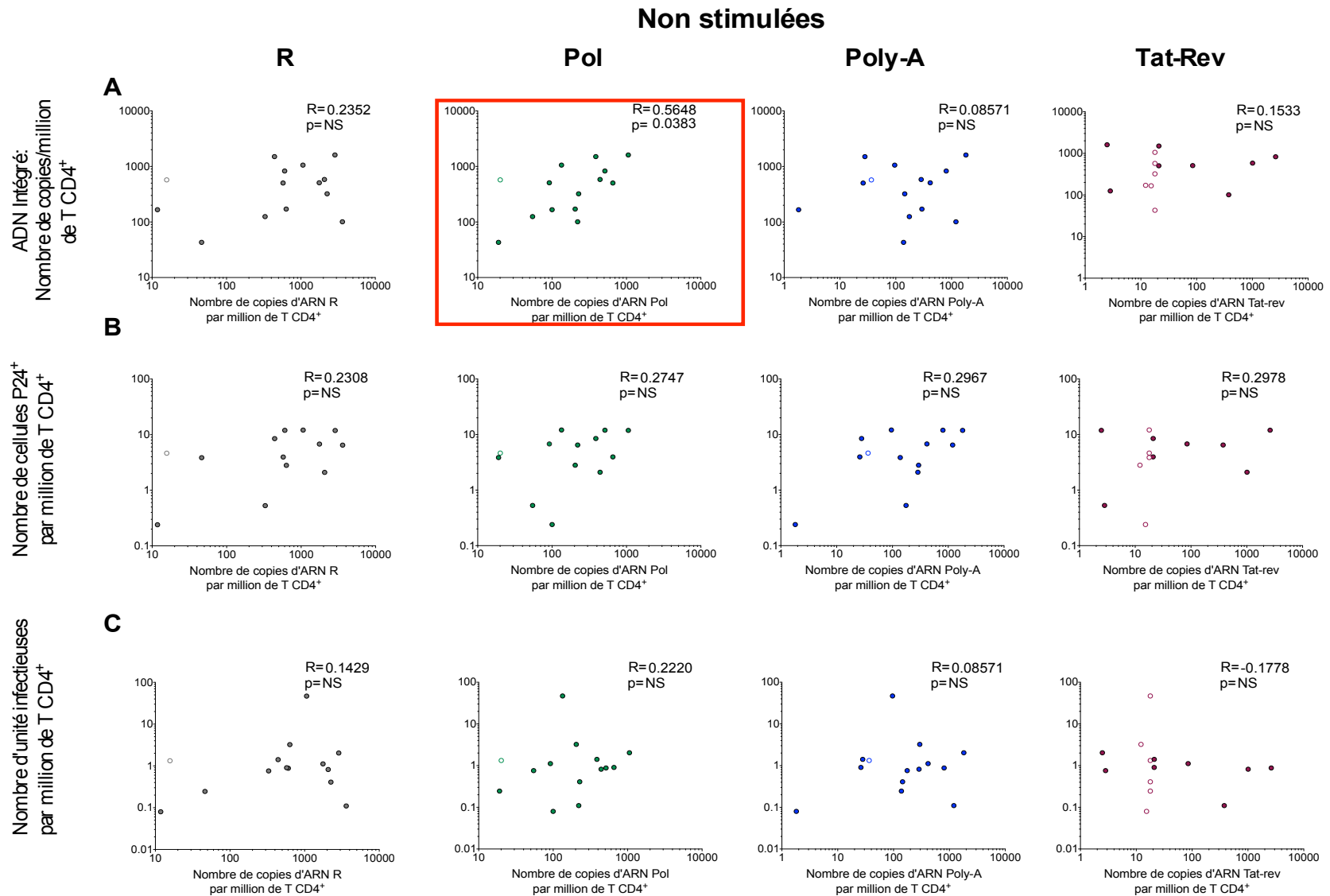


Figure 20. La fréquence de cellules contenant de l'ADN du VIH intégré corrèle avec la quantité de transcrits Pol dans les lymphocytes T CD4⁺ non stimulés. Les mesures d'ARN ont été faites sur les lymphocytes T CD4⁺ purifiés de 14 individus infectés par le VIH sous thérapie antirétrovirale. **A)** Corrélations entre la quantité d'ARN mesurée par RT-PCR et la fréquence de cellules contenant de l'ADN du VIH intégré. **B)** Corrélations entre la quantité d'ARN mesurée par RT-PCR et la fréquence de cellules exprimant la protéine P24. **C)** Corrélations entre la quantité d'ARN mesurée par RT-PCR et la fréquence de réservoirs infectieux. Les symboles vides représentent la limite de détection pour chaque individu. Le carré rouge représente l'unique corrélation statistiquement significative. Le test statistique utilisé est le test de corrélation Spearman

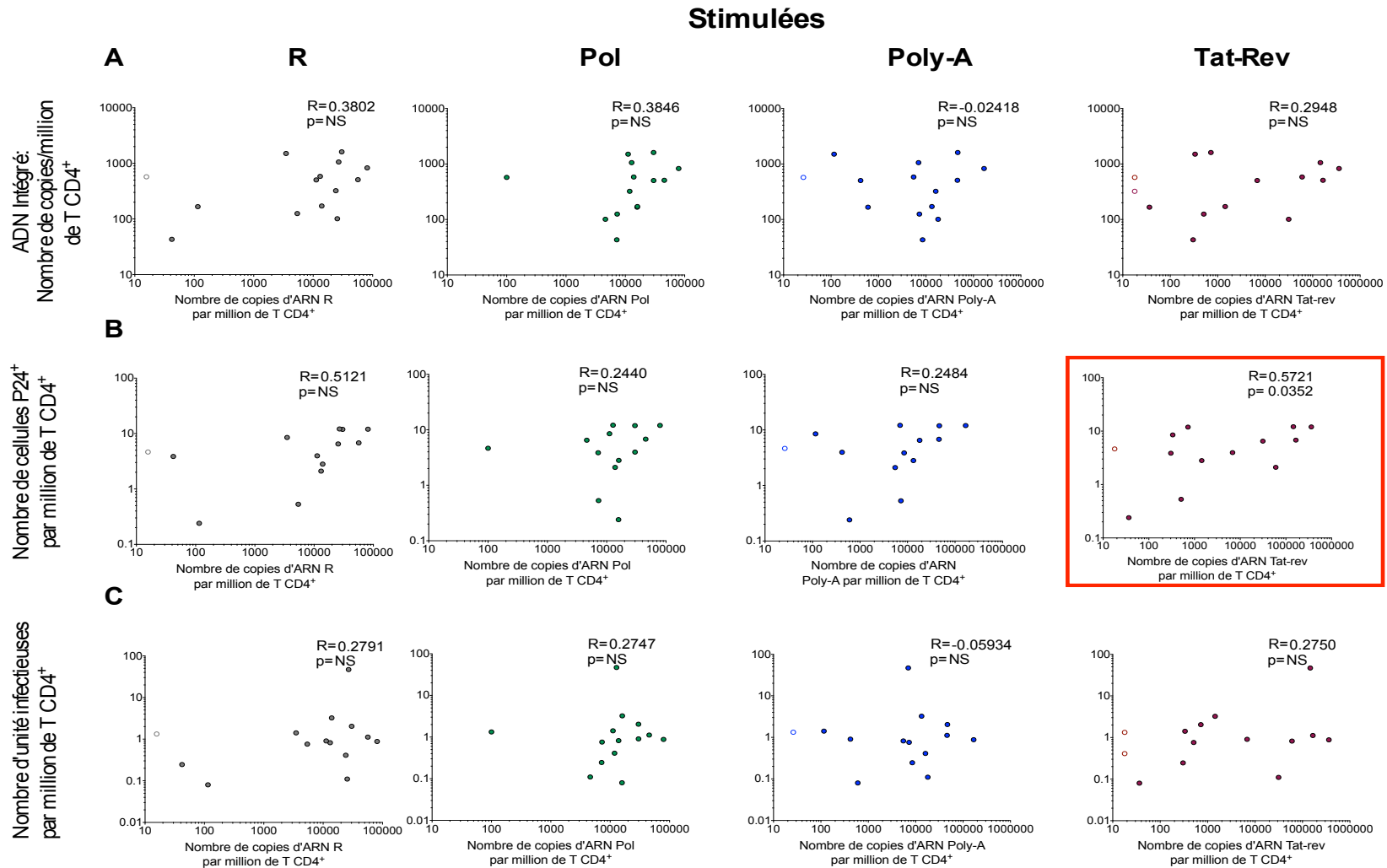


Figure 21. La production de protéine P24 corrèle avec la quantité de transcrits Tat-Rev dans les lymphocytes T CD4⁺ stimulés. Les mesures d'ARN ont été faites sur des lymphocytes T CD4⁺ purifiés provenant de 14 individus infectés par le VIH sous thérapie antirétrovirale et stimulés par PMA(100ng/mL) et la ionomycine (1µg/mL) pendant 18h. **A)** Corrélations entre la quantité d'ARN mesurée par RT-PCR et la fréquence de cellules contenant de l'ADN du VIH intégré. **B)** Corrélations entre la quantité d'ARN mesurée par RT-PCR et la fréquence de cellules exprimant la protéine P24. **C)** Corrélations entre la quantité d'ARN mesurée par RT-PCR et la fréquence de réservoirs infectieux. Les symboles vides représentent la limite de détection pour chaque individu. Le carré rouge représente l'unique corrélation statistiquement significative. Le test statistique utilisé est le test de corrélation Spearman

3.3 Impact de différents agents anti-latence sur l'induction transcriptionnelle au sein des lymphocytes T CD4⁺

Afin d'évaluer l'impact de différentes classes et combinaisons d'agents anti-latence sur le profil de réactivation transcriptionnelle du VIH au sein de lymphocytes T CD4⁺ totaux, nous avons utilisé notre technique de RT-PCR quantitative afin de mesurer les différentes formes de transcrits présents après exposition aux différents agents évalués.

3.3.1 Concentrations CE50 (concentration efficace médiane)

Afin d'évaluer l'impact de différentes classes d'agents anti-latence sur l'expression de différents transcrits du VIH, nous avons purifié les lymphocytes T CD4⁺ de 3 individus infectés par le VIH sous thérapie antirétrovirale et nous avons stimulé les cellules pour une durée de 24h avec: l'inhibiteur de bromodomaine, JQ-1(10μM); les HDACi Panobinostat (Pano, 5nM) et Romidepsine (Romi,10nM); les agonistes de PKC Bryostatine (Bryo, 25nM), Ingénol (Ing, 25nM) et la PMA (100ng/mL), ainsi qu'un activateur des voies calciques, la ionomycine (io,1μg/mL).

L'ARN a été extrait et les mesures des différents transcrits ont été faites par RT-PCR. Nous avons observé une faible augmentation relative des transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-Rev avec le panobinostat (HDACi) (Médiane=1,5x, 2,9x, 1,5x et 3,5x respectivement) (Figure 22). Nous avons mesuré une augmentation relative des transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-Rev similaire avec la romidepsine (HDACi) et le JQ-1 (inhibiteur de bromodomaine) comparativement à la condition non stimulée (Médiane=4,5x, 6,2x, 4,3x et 35x respectivement pour la romidepsine; 4,5x, 8,5x, 3,6x et 43x respectivement pour le JQ-1). En utilisant

l'agoniste de PKC Bryostatine, nous avons observé une modeste induction relative des transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-Rev par rapport à la condition non stimulée (Médiane=4x, 20x, 11x et 144x respectivement). C'est avec ingénol (agoniste de PKC) que nous avons observé une des plus fortes inductions de la transcription relativement aux cellules non stimulées (Médiane=13x, 68x, 37x et 243x respectivement). La condition PMA+ionomycine, qui représente notre potentiel de stimulation maximale, était la plus efficace dans l'induction de la transcription pour R, Pol, Poly-A et Tat-Rev (Médiane=54x, 249x, 59x et 2 598x respectivement).

Nous avons donc observé une induction de la transcription plus efficace par l'agoniste de PKC ingénol comparativement aux autres agents pharmacologiques utilisés, et ce, pour tous les transcrits mesurés.

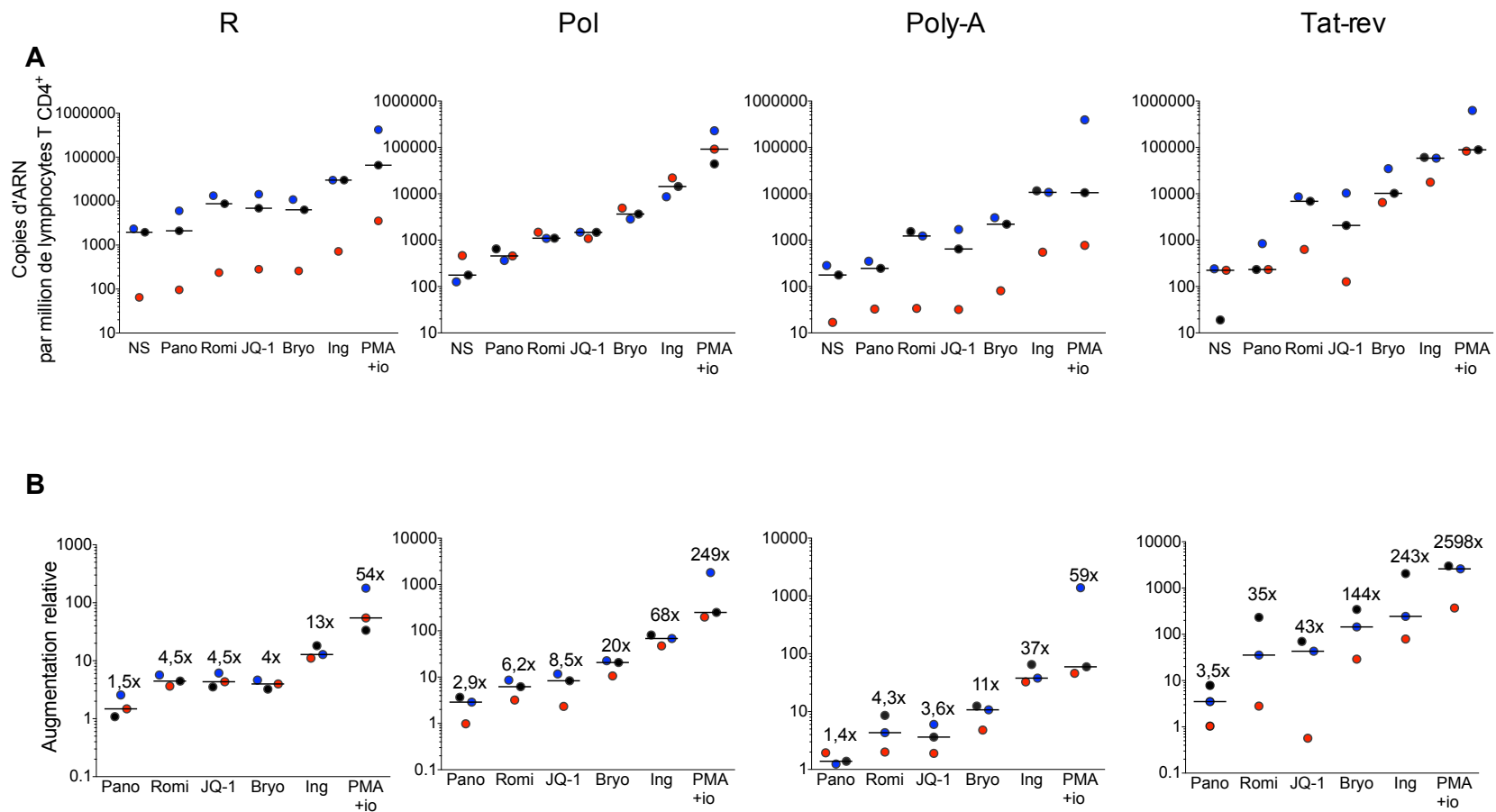


Figure 22. L'activation par l'ingénol induit une forte augmentation de transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-rev comparativement aux autres agents. Les T CD4⁺ purifiés de 3 individus infectés par le VIH sous thérapie antirétrovirale ont été stimulés pendant 24h avec: JQ-1(10μM); Panobinostat (Pano, 5nM); Romidepsine (Romi,10nM); Bryostatine (Bryo, 25nM); Ingénol (Ing, 25nM); PMA (100ng/mL); ionomycin (io,1μg/mL). **A)** Nombre de copies d'ARN par million de lymphocytes T CD4⁺. **B)** Augmentation relative des différents transcrits par rapport à la condition non stimulée.

3.3.2 Concentrations à effet maximal, et combinaisons

Afin d'atteindre l'induction transcriptionnelle du VIH-1 la plus forte possible en augmentant les concentrations et en combinant les différents agents anti-latence, nous avons utilisé la même stratégie que celle décrite en 3.3.1, mais avons utilisé des concentrations supérieures à celles décrites précédemment soit : JQ-1(10 μ M); Panobinostat (Pano, 100nM); Ingénol (Ing, 500nM); PMA (100ng/mL); ionomycine (io,1 μ g/mL); DMSO (0,1%). Les concentrations choisies ont été déterminées grâce aux expériences de doses-réponses pharmacologiques faites par une étudiante de notre laboratoire afin de déterminer à quelles concentrations les composés à l'étude atteignaient un effet maximal. Les combinaisons suivantes ont aussi été testées : 1)Panobinostat + Ingénol + JQ-1 et 2) Panobinostat + Ingénol. Ces résultats sont encore préliminaires, car nous avons utilisé un échantillon provenant d'un seul individu pour cette expérience (représenté par un cercle bleu sur la figure 22). La condition DMSO a peu d'effet sur la transcription comparativement à la condition non stimulée pour les transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-Rev (1x, 1x, 2x, 1x respectivement) (Figure 23-B). Nous avons mesuré une augmentation modeste de transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-Rev par rapport à la condition non stimulée lors d'une stimulation avec l'inhibiteur de bromodomaine JQ-1 (2x, 2x, 5x, 26x respectivement). Le HDACi panobinostat a induit une augmentation de la transcription un peu plus forte que le JQ-1 par rapport à la condition non stimulée pour les transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-Rev (6x, 9x, 8x et 54x respectivement). L'agoniste de PKC ingénol seul a induit une forte augmentation des transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-rev par rapport à la condition non stimulée (16x, 76x, 277x, 576x respectivement). Concernant les combinaisons de différents composés, la combinaison d'un inhibiteur de

bromodomaine (JQ-1) et d'un HDACi (panobinostat) a induit une augmentation de la transcription supérieure à l'ingénol seul (39x, 166x, 675x, 867x pour les transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-Rev respectivement). La combinaison panobinostat, ingénol et JQ-1 a induit la transcription de manière similaire à la combinaison sans JQ-1, à l'exception d'une faible augmentation pour les transcrits Tat-Rev avec le JQ-1 (45x, 155x, 514x, 1 217x respectivement). L'induction maximale par rapport à la condition non stimulée a été observée avec la stimulation par la combinaison PMA et ionomycine (44x, 339x, 1 312x, 2 158x pour les transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-Rev respectivement).

Comme nous l'avons décrit au paragraphe 3.3.1, nous avons observé une quantité supérieure de transcrits R par rapport aux transcrits Pol, Poly-A et Tat-Rev dans la condition non stimulée (Médiane=3 780, 400, 136 et 240 copies/million de lymphocytes T CD4⁺) (Figure 23-B). De même, nous avons mesuré des quantités d'ARN R, Pol, Poly-A et Tat-Rev relativement similaires lors de la stimulation maximale par PMA et ionomycine (Médiane=167 000, 132 000, 180 000 et 519 000) respectivement. Nous constatons que les quantités de transcrits R dans la condition (panobinostat + ingénol + JQ-1) sont similaires aux quantités mesurées en PMA + ionomycine (Médiane=170 580, 167 000 respectivement). En revanche, nous avons mesuré pour les autres transcrits, dans les conditions les plus proches de la réactivation maximale (panobinostat + ingénol pour Pol et Poly-A et panobinostat + ingénol + JQ-1 pour Tat-Rev), des quantités de transcrits Pol, Poly-A et Tat-Rev inférieures à celles mesurées en PMA + ionomycine (Médiane=66 000 vs 134 000, 92 000 vs 180 000, 29 000 vs 520 000 respectivement). Nous avons ainsi noté que les combinaisons des différentes classes d'agents anti-latence semblent être les plus efficaces dans l'induction de la transcription pour tous les transcrits mesurés comparativement aux agents pharmacologiques seuls, mais qu'ils

restent sous-optimaux dans leur capacité à induire des niveaux similaires à la PMA + ionomycine pour Pol, Poly-A et Tat-Rev.

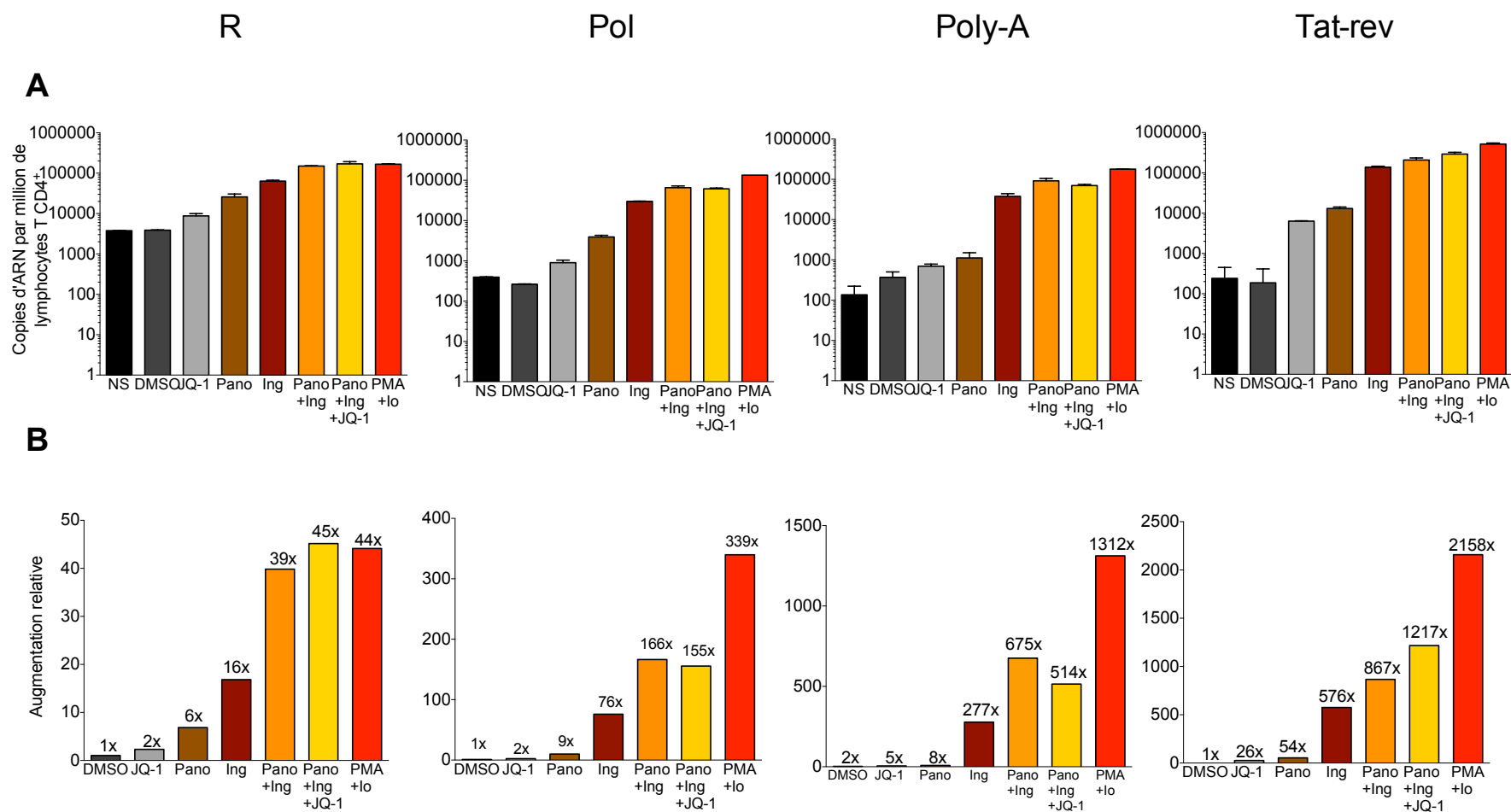


Figure 23. Les combinaisons d'agents pharmacologiques hautement concentrés induisent une transcription d'ARN R maximale et une transcription d'ARN Pol, Poly-A et Tat-Rev sous-optimale. Les T CD4⁺ purifiés d'un individu infecté par le VIH sous thérapie antirétrovirale ont été stimulés pendant 24h avec: JQ-1(10μM); Panobinostat (Pano, 100nM); Ingénol (Ing, 500nM); PMA (100ng/mL); ionomycine (io, 1μg/mL); DMSO (0,1%). **A**) Nombre de copies d'ARN par million de lymphocytes T CD4⁺. **B**) Augmentation relative des différents transcrits par rapport à la condition non stimulée.

3.4 Quantification des transcrits au sein de sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires

Afin d'infirmar ou de confirmer notre hypothèse de départ, nous avons utilisé notre technique de RT-PCR quantitative pour mesurer les différentes formes de transcrits du VIH dans le but d'établir un profil transcriptionnel au sein de différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires à l'état de latence.

3.4.1 Stratégie de tri par cytométrie de flux

Afin de déterminer le profil transcriptionnel des sous-populations de cellules T CD4⁺ mémoires, nous avons trié 4 populations cellulaires par cytométrie de flux: T CD4⁺ naïves, T CD4⁺ centrales mémoires, T CD4⁺ transitionnelles mémoires et T CD4⁺ effectrices mémoires (CD45RA⁺/CCR7⁺/CD27⁺, CD45RA⁻/CCR7⁺/CD27⁺, CD45RA⁻/CCR7⁻/CD27⁺, CD45RA⁺/CCR7⁻/CD27⁻, respectivement) (Figure 14).

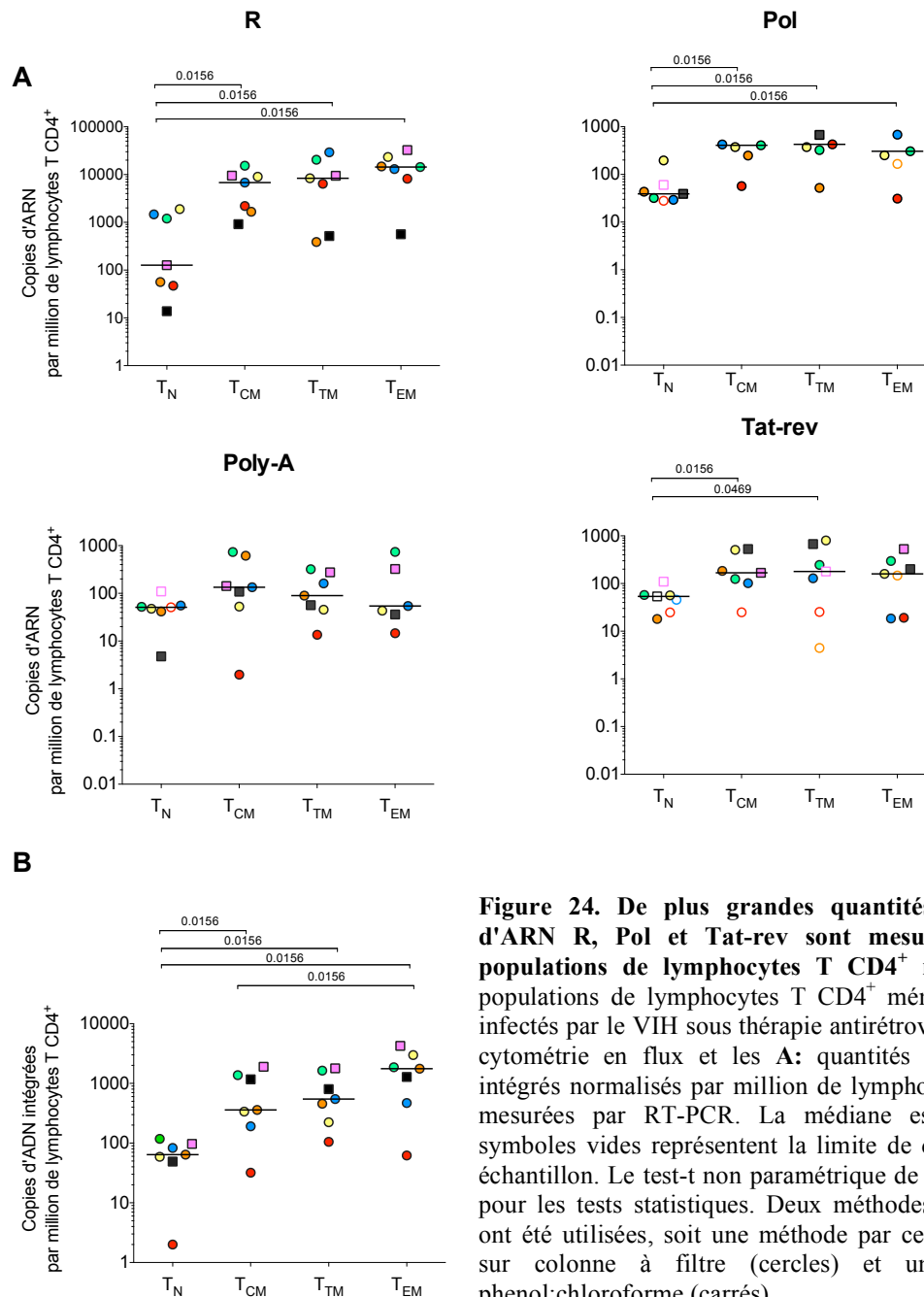
3.4.2 Quantification d'ADN et d'ARN dans les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires

Afin de mesurer la quantité des différents transcrits au sein des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires, nous avons extrait l'ARN des sous-populations triées et avons mesuré par RT-PCR les quantités d'ARN en utilisant nos méthodes de RT-PCR ultrasensibles. Concernant l'ARN R, nous avons observé des niveaux significativement plus élevés dans les sous-populations T_{CM}, T_{TM} et T_{EM} comparativement au T_N (Médiane=6 790, 8

350, 14 415 et 126 copies, respectivement, avec un $p=0,0156$ entre T_N et T_{CM} , T_{TM} et T_{EM}) (Figure 24-A). Nous n'avons pas observé de différence significative entre les sous-populations de cellules mémoires. Des résultats similaires ont été obtenus pour les transcrits Pol, pour lesquels nous avons observé une médiane significativement plus élevée dans les sous-populations T_{CM} , T_{TM} et T_{EM} comparativement aux T_N (Médiane=407, 427, 305 et 39 copies respectivement, avec un $p=0,0156$ entre T_N et T_{CM} , T_{TM} et T_{EM}). Là encore, aucune différence significative n'a été notée entre les autres sous-populations mémoires entre elles. Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les quantités d'ARN poly-A à travers les différentes sous-populations de lymphocytes T $CD4^+$ mémoires (Médiane=50, 134, 90, 54 copies/million de lymphocytes pour les T_N , T_{CM} , T_{TM} et T_{EM} respectivement). En revanche, nous avons mesuré une plus grande quantité de transcrits Tat-Rev exprimés dans les sous-populations T_{CM} et T_{TM} par rapport à la sous-population T_N (T_N et T_{CM} $p=0,0156$ et T_N et T_{TM} $p=0,0469$), avec des valeurs médianes de 168, 178 et 53 copies respectivement. Aucune différence statistiquement significative n'a été notée entre les sous-populations T_{CM} , T_{TM} et T_{EM} .

La figure 24-B représente les quantités d'ADN VIH proviral (intégré dans le génome de l'hôte) au sein des différentes sous-populations de lymphocytes T $CD4^+$ mémoires. Nous avons observé une plus grande quantité d'ADN proviral dans les T_{CM} , T_{TM} et T_{EM} par rapport aux cellules T naïves (médiane=360, 547, 1756 et 64 copies d'ADN VIH proviral/million de cellules respectivement. $p=0,0156$ pour toutes les paires). Nous avons également noté une plus grande quantité d'ADN proviral dans les T_{EM} par rapport aux T_{CM} ($p=0,0156$). En revanche, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les sous-types T_{TM} et T_{EM} ($p=0,0781$).

En conclusion, les cellules mémoires (T_{CM} , T_{TM} et T_{EM}) sont caractérisées par une plus grande quantité d'ARN R, Pol et Tat-rev et une plus grande quantité d'ADN proviral comparativement aux T_N



3.4.3 Normalisation des mesures d'ARN par unité provirale dans les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires

Afin d'évaluer la contribution de la taille du réservoir intégré dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires sur les différentes quantités d'ARN mesurées nous avons normalisé les quantités de transcrits mesurés en 3.4.2 par unité provirale (Figure 25). Nous avons mesuré des quantités similaires de transcrits par unité provirale entre les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires (Médiane R=10, 11, 12, 7; Médiane Pol=0,7, 1,1, 0,8, 0,5; Médiane Poly-A=0,7, 0,2, 0,2, 0,1; Médiane Tat-Rev=0,95, 0,5, 0,2, 0,09 pour T_N, T_{CM}, T_{TM} et T_{EM} respectivement). Après normalisation par unité provirale, nous n'avons donc pas noté de différences significatives concernant les quantités de transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-Rev entre les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires, reflétant ainsi des niveaux de transcription d'ARN VIH similaires par unité provirale de chaque transcrit au sein des différentes sous-populations. Ces résultats suggèrent que l'activité transcriptionnelle est similaire entre les différentes sous-populations de cellules T CD4⁺.

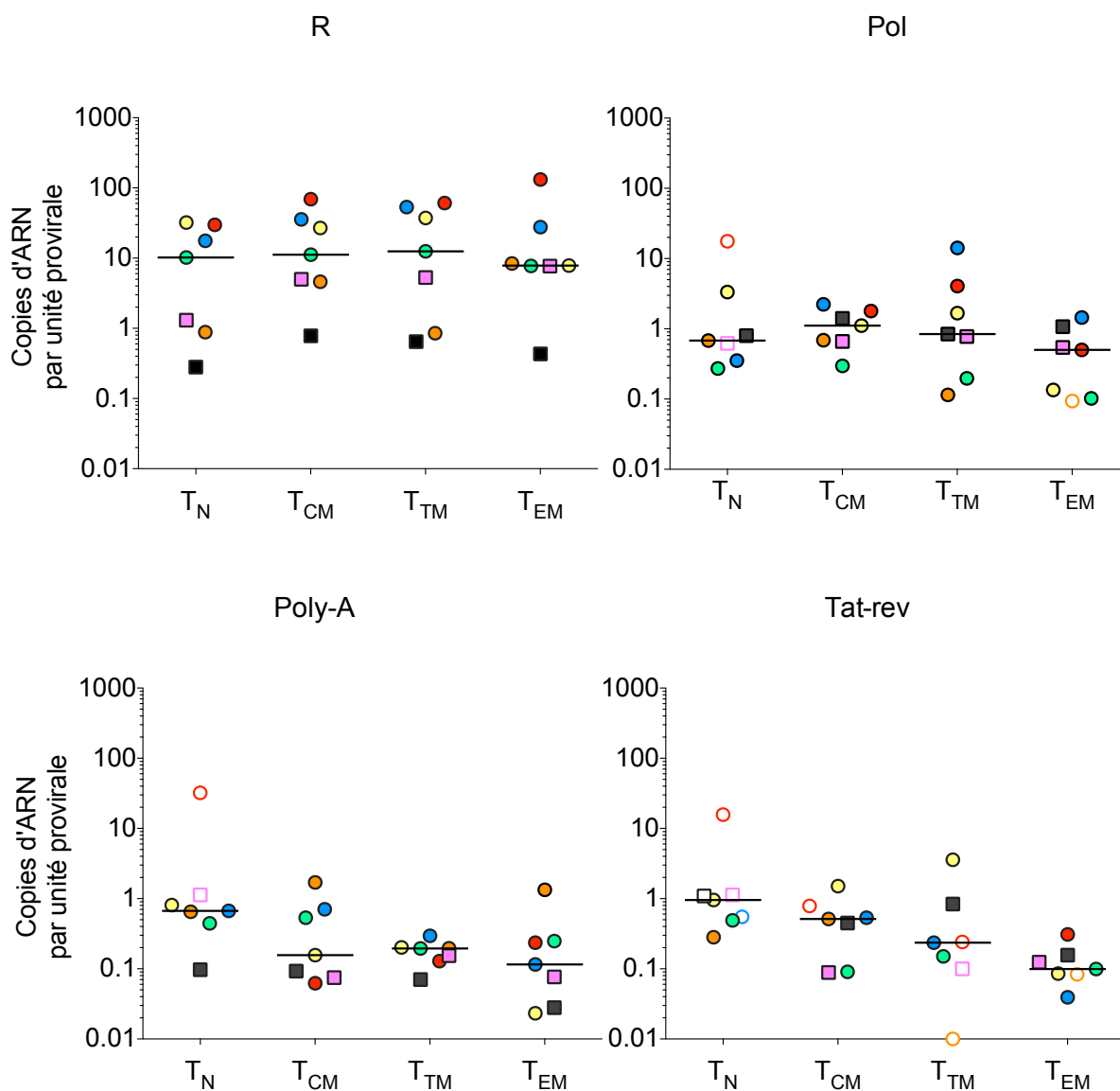


Figure 25. Les transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-rev sont produits en quantité similaire par unité provirale dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires. Les sous-populations T CD4⁺ mémoires de 7 individus infectés par le VIH sous thérapie antirétrovirale ont été triées par cytométrie en flux et les quantités de différents transcrits ont été mesurées par RT-PCR. La médiane est représentée et les symboles vides représentent la limite de détection pour chaque échantillon. Deux méthodes d'extractions d'ARN ont été utilisées, soit une méthode par centrifugation/extraction sur colonne à filtre (cercles) et une extraction acide-phenol:chloroforme (carrés).

3.4.4 Profil transcriptionnel au sein des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires

Afin d'établir le profil transcriptionnel au sein de chaque sous-population de lymphocytes T CD4⁺ mémoires, nous avons normalisé les quantités d'ARN mesurées en RT-PCR par million de lymphocytes T CD4⁺. Notre hypothèse initiale était qu'il y aurait des blocages différents entre les sous-populations, avec des sous-populations plus différenciées, comme les T_{EM} avec une plus grande production de transcrits d'élongations distales, de maturation et de polyépissage. En contrepartie, nous nous attendions à des profils transcriptionnels plus restreints dans les T_{CM}, en raison de leur profil moins activé.

Concernant les lymphocytes T CD4⁺ naïfs, nous avons observé des quantités similaires des ARN R, Pol, Poly-A et Tat-Rev (Médiane= 126, 39, 51, 54 copies/million de T CD4⁺ respectivement) (Figure 26). Nous avons noté une forte variation dans les quantités de R mesurées avec un minimum de 14 et un maximum de 1896 copies. Au sein de lymphocytes T CD4⁺ mémoires centrales, nous avons mesuré des quantités supérieures de transcrits R comparativement aux transcrits Pol, Poly-A et Tat-Rev (médiane= 6 791, 407, 134 et 168 copies/million de T CD4⁺ respectivement. $p=0,0313$ pour R vs Pol; $p=0,0156$ pour R vs Poly-A; $p=0,0156$ pour R vs Tat-Rev). Concernant la sous-population mémoire transitionnelle, nous avons mesuré un profil similaire à celui des T_{CM} avec une plus grande proportion de transcrit R que de transcrits Pol, Poly-A et Tat-Rev (Médiane=8 353, 427, 89, 178 copies/million de T CD4⁺ respectivement. $p=0,0313$ pour R vs Pol; $p=0,0156$ pour R vs Poly-A; $p=0,0313$ pour R vs Tat-Rev). En revanche, nous avons observé une quantité de transcrits Pol supérieure aux transcrits Poly-A de manière significative ($p=0,0469$). Finalement, au sein de la sous-

population T_{EM}, et de manière similaire aux T_{CM} et T_{TM}, nous avons observé une augmentation significative dans les transcrits de types R comparativement aux transcrits Pol, Poly-A et Tat-Rev (Médiane=14 400, 305, 54, 159 copies/million de T CD4⁺ respectivement. p=0,0313 pour R vs Pol; p=0,0156 pour R vs Poly-A; p=0,0156 pour R vs Tat-Rev). Nous avons également mesuré une quantité de transcrits Pol supérieure à Tat-rev (p=0,0156). Nous avons donc observé des profils transcriptionnels similaires entre les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires transitionnelles, effectrices et centrales. Ces trois sous-populations mémoires semblent différer des cellules naïves.

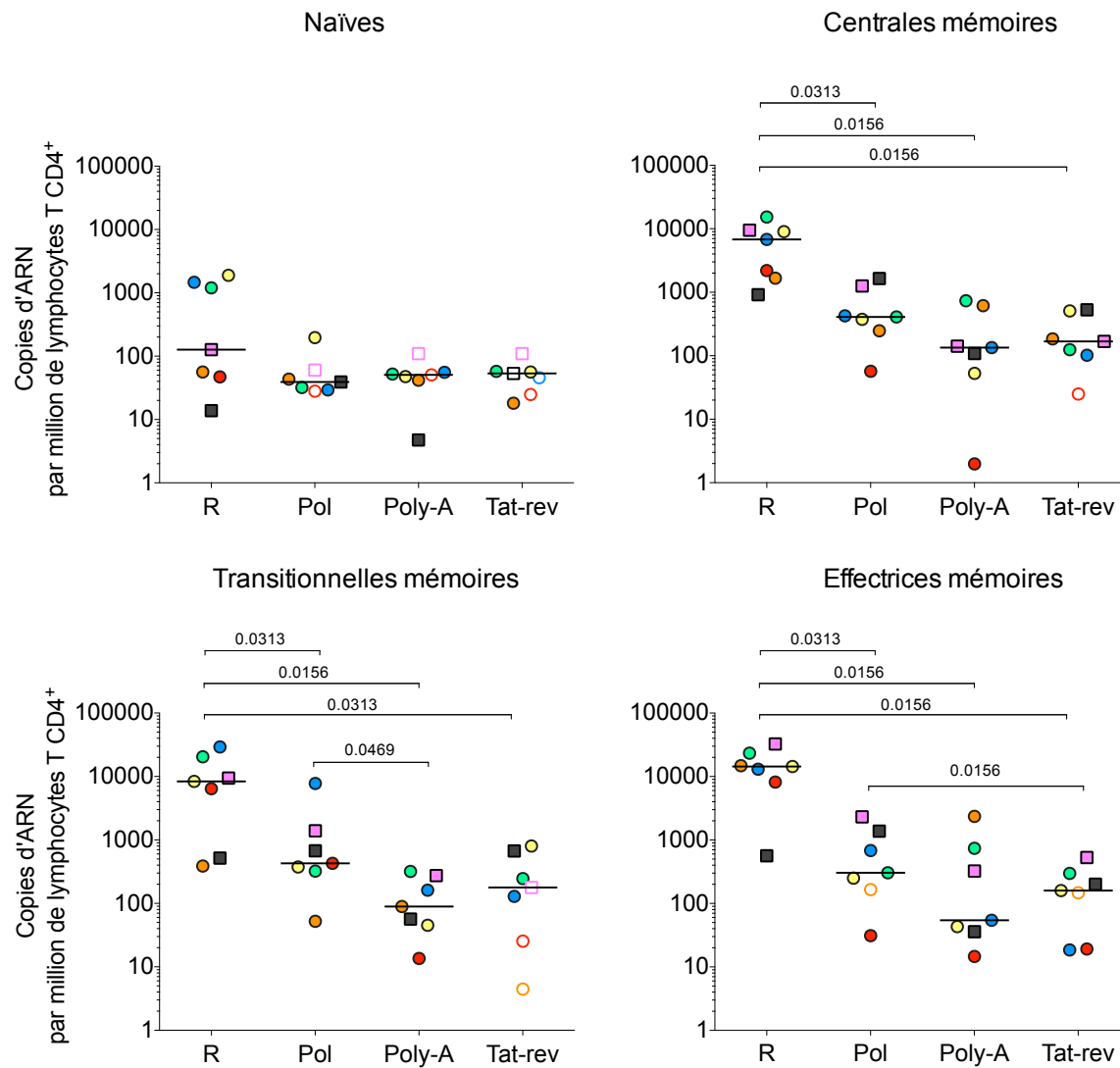


Figure 26. Les profils transcriptionnels sont similaires dans les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires. Les sous-populations T CD4⁺ mémoires de 7 individus infectés par le VIH sous thérapie antirétrovirale ont été triées par cytométrie en flux. Les quantités de différents transcrits ont été mesurées par RT-PCR. La médiane est représentée et les symboles vides représentent la limite de détection pour chaque échantillon. Le test-t non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé pour les tests statistiques. Deux méthodes d'extractions d'ARN ont été utilisées, soit une méthode par centrifugation/extraction sur colonne à filtre (cercles) et une extraction acide-phenol:chloroforme (carrés).

Chapitre 4 : Discussion

Afin d'identifier les mécanismes qui régissent l'état de latence du VIH dans les lymphocytes T CD4⁺ mémoires ainsi que dans ses sous-populations, nous avons choisi d'analyser une composante fondamentale de la latence du VIH, la transcription (Karn and Stoltzfus 2012). Nous avons donc établi un profil transcriptionnel permettant de mesurer les proportions des différents transcrits du VIH à l'état latent, ainsi qu'à l'état activé. Le but de cette approche est d'identifier des étapes de la transcription potentiellement plus sensibles à la réactivation transcriptionnelle, et ainsi favoriser une réactivation du cycle viral optimale. Pour pouvoir établir ce profil transcriptionnel, nous avons mis au point des techniques de RT-PCR quantitatives nous permettant de mesurer précisément différents types de transcrits, soit les transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-Rev.

4.1 Validation de la technique de RT-PCR et des standards ARN

Nous avons observé, pour la majorité des individus, des courbes d'amplification classiques (1.Phase exponentielle; 2.Phase linéaire; 3. Phase plateau (Yuan et al. 2006)), démontrant ainsi que les oligonucléotides et les sondes fluorescentes de RT-PCR étaient appropriés pour la détection efficace de transcrits du VIH chez les individus infectés (7/8 pour R, 8/8 pour Pol, 7/8 pour Poly-A et 6/8 pour Tat-Rev) (Figure 15). Il est important de noter que pour certains transcrits comme Tat-Rev et Poly-A, nous avons observé davantage de variations dans la qualité des courbes d'amplifications comparativement aux transcrits R et

Pol. Ceci pourrait être causé par des délétions ou des hypermutations (Ho et al. 2013) ainsi qu'à la diversité nucléotidiques accrue au sein de la région Tat-Rev (Li et al. 2015; Procopio et al. 2015). Pour poly-A, il est possible que la longue queue poly-dT de l'oligonucléotide déstabilise l'affinité de liaison entre celui-ci et le transcrit chez certaines souches virales qui pourraient porter des mutations particulières accentuant cet effet. Pour obtenir une quantification absolue par RT-PCR des différents transcrits présents dans nos échantillons, nous avons synthétisé des standards ARN par transcription *in vitro* pour chacun de nos transcrits d'intérêt. L'avantage de l'utilisation de standards ARN comparativement aux standards ADN réside dans le fait que nous contrôlons pour l'efficacité de l'étape de la transcription inverse qui pourrait varier en fonction de la longueur et de la nature des transcrits (Huggett et al. 2005). Nous avons, suite à la transcription *in vitro*, dilué nos transcrits dans de l'ARN extrait provenant de cellules d'individus non infectés par le VIH pour augmenter la concentration de nos standards afin d'améliorer leur qualité de conservation (Olivieri et al. 2014). En utilisant un 2100 Bioanalyzer, nous avons obtenu des mesures précises de la taille et de la concentration de chacun de nos standards (Sodowich, Fadl, and Burns 2007) (Devonshire, Elaswarapu, and Foy 2011) (Figure 16). Nous avons par la suite évalué l'efficacité et le coefficient de linéarité pour chacun de nos standards ARN et avons mesuré des valeurs acceptables (Devonshire, Elaswarapu, and Foy 2011) pour ces deux paramètres, basées sur la moyenne de 5 réactions de RT-PCR différentes (Figure 17). Nous avons aussi observé une bonne sensibilité pour nos standards ARN, capable de détecter environ 5, 6, 10 et 5 copies par réaction de RT-PCR pour les transcrit R, Pol, Poly-A et Tat-Rev respectivement (Figure 18). Bien que la sensibilité soit plus faible pour la RT-PCR Poly-A comparativement

aux autres transcrits, elle demeure satisfaisante et est similaire à celle trouvée par les créateurs de cet oligonucléotide (*Shan et al. 2013*).

4.2 Profil transcriptionnel du VIH au sein de lymphocytes T CD4⁺ au repos

Les données de la littérature indiquent qu'à l'état de latence, une accumulation des transcrits très courts du VIH (environ 59 nucléotides) par rapport aux transcrits plus longs est présente. Cela est majoritairement causé par un blocage de la transcription au niveau d'une structure secondaire en boucle (TAR) présente dans la région R (Kaiser et al. 2017) (Kao et al. 1987) (Adams et al. 1994). L'arrêt de l'ARN polymérase II cellulaire (Natarajan et al. 2013) sur la région TAR pourrait être dû au facteur cellulaire (NELF) qui, en se liant à la cette région (Zhang et al. 2007), empêche le recrutement du complexe crucial d'élongation de la transcription du VIH Tat/P-TEFb (Asamitsu and Okamoto 2017) et provoque ainsi la terminaison prématurée de la transcription virale. En effet, le complexe Tat/P-TEFb permet la phosphorylation de la queue C-terminale de l'ARN polymérase II et augmente drastiquement son efficacité de transcription (Asamitsu and Okamoto 2017). Il est important de différencier les transcrits de types TAR, qui sont inclus dans chaque transcrit produit par le VIH (Yukl et al. 2018) avec les transcrits R que nous avons mesurés ici, représentant les transcrits qui ont poursuivi l'initiation de la transcription après la boucle TAR. Nous avons mesuré une quantité médiane d'environ 600 copies d'ARN R par million de lymphocytes T CD4⁺ non stimulés (Figure 19-A), comparativement à environ 25 000 copies d'ARN TAR (Yukl et al. 2018), reflétant une différence d'environ 40x entre les événements d'initiation de la transcription (TAR) et d'initiation de l'élongation après la boucle TAR (R). Il est important de mentionner

que nous avons mesuré des quantités de transcrits R très basses dans 3 échantillons (9, 36 et 37), ce qui pourrait être dû à la présence de mutations ou de délétions dans la région R empêchant une bonne détection des ARN. Les données de la littérature indiquent également une différence prononcée entre les événements d'initiations de la transcription (TAR) et les événements d'élongation allant jusqu'à la fin du 5'*LTR* ou même au début de la région *Gag* (100x et 10x dans (Adams et al. 1994) et (Yukl et al. 2018) respectivement). De façon identique, nous observons donc une forte inhibition de l'élongation après la région TAR. Une quantité plus faible de P-TEFb est retrouvée dans les lymphocytes T CD4⁺ au repos, pouvant ainsi expliquer une diminution des événements d'élongations de la transcription (Budhiraja and Rice 2013). Nous avons aussi observé une différence entre la quantité de transcrits R et les transcrits Pol, représentant l'élongation distale de la transcription (619 vs 213 copies/million de lymphocytes T CD4⁺) (Figure 19-A). Cette différence de 3 fois met en évidence une potentielle étape limitante additionnelle dans le processus de transcription du VIH à l'état latent, soit un blocage dans l'élongation distale des transcrits. Yukl et al. (Yukl et al. 2018) ont fait une observation similaire, avec une différence d'environ 3 fois entre les transcrits LTR-Gag et les transcrits Pol. Bien que les régions des transcrits mesurés ne soient pas identiques dans notre étude et dans celle de Yukl et al., cela reflète tout de même une proportion inférieure de transcrits d'élongation distale comparativement aux transcrits d'élongation proximale (après la région TAR). Il semble qu'il n'y ait pas de différence significative entre les proportions de nos transcrits Pol et les transcrits Poly-A (médiane= 213 et 160 respectivement), suggérant que la majorité des transcrits Pol produits, bien qu'en faibles proportions, atteignent l'étape de maturation. Ainsi, il n'y aurait pas de blocage spécifique à l'étape de polyadénylation des transcrits du VIH dans les cellules à l'état latent. Nos résultats

différent ici de Yukl et al. (Yukl et al. 2018) qui ont mesuré environ 3,6x plus de transcrits Pol que de transcrits Poly-A (médiane= 926 et 254 respectivement). Il est à noter que la région Pol que nous amplifions se situe en région distale du gène, tandis que la région amplifiée par Yukl et al. se trouve dans une région au milieu du gène. Cela suggère qu'une étape additionnelle de blocage de l'élongation pourrait exister entre ces deux régions du gène *Pol*. Nos mesures de transcrits Poly-A sont similaires à celle retrouvée dans plusieurs études ((Yukl et al. 2018) et (Bullen et al. 2014)). Les transcrits Tat sont connus pour être les ARN cruciaux lors de l'activation de la transcription efficace du VIH (Karn and Stoltzfus 2012). Il n'est donc pas étonnant de constater que 43% des échantillons non stimulés que nous avons étudiés montraient des niveaux indétectables, avec une médiane d'environ 18 copies/millions de lymphocytes T CD4⁺, comparable aux 9 copies/millions de lymphocytes T CD4⁺ mesurés par (Yukl et al. 2018). En revanche, nous avons noté une grande variation dans les quantités de Tat-Rev au sein de nos échantillons, avec 3 individus (17, 28, 32) possédant des valeurs très élevées (377, 1010 et 2 615 copies/millions de lymphocytes T CD4⁺ respectivement). Il est important de noter que nous avons utilisé une technique différente de Yukl et al. (Yukl et al. 2018). Premièrement, nos cellules ont été mises en culture pour une période de 18h comparativement à la technique *ex vivo* utilisée par son équipe et il est possible que les 3 échantillons montrant des valeurs élevées de Tat-Rev aient subi une réactivation stochastique suite à la culture de 18h, augmentant ainsi les niveaux d'ARN mesurés. Par ailleurs, la technique de PCR utilisée pour nos expériences est une RT-PCR, comparée à la technique de PCR digitale utilisée par Yukl et al. Il est important de mentionner qu'il existe une grande variabilité de quantités d'ARN pour un transcrit donné (Tat-Rev), mais également dans les différents profils de transcription. Par exemple, si nous analysons l'échantillon 31 de la figure

19-A, nous avons constaté une diminution progressive de la quantité absolue de transcrits ($R > Pol > Poly-A > Tat-Rev$), avec une quantité inférieure à la limite de détection pour Tat-Rev. En revanche, pour l'échantillon 28, nous constatons qu'il existe toujours une plus grande quantité de transcrits R que de transcrits Pol et Poly-A, mais une quantité absolue de transcrits Tat-Rev de 2,3x et 3,5x supérieure aux transcrits Pol et Poly-A, respectivement. Il est possible que ces différences soient causées par des limites de notre technique, ou explicable par l'existence de profils transcriptionnels latents naturellement différents entre différentes personnes.

4.3 Modulation du profil transcriptionnel du VIH au sein de lymphocytes T CD4⁺ après stimulation par la PMA et l'ionomycine

L'activation par la PMA et la ionomycine provoque une forte augmentation dans les niveaux de transcription en général, et augmente de manière plus importante la transcription de type Pol, Poly-A et Tat-Rev, comparativement à R (Figure 19-B et C). Des observations similaires ont été rapportées par différents groupes concernant l'augmentation préférentielle de certains de transcrits (Yukl et al. 2018) (Bullen et al. 2014). Après stimulation, nous avons observé une médiane statistiquement similaire entre les quantités de transcrits R, Pol, Poly-A et Tat-Rev, indiquant que les niveaux de transcription d'élongation, de maturation et de polyépissages ont atteint des niveaux similaires aux événements d'initiation de l'élongation (après la boucle TAR). Des résultats similaires ont été retrouvés après normalisation par unité provirale pour les conditions stimulées et non stimulées (Figure 19-D et E). Ces observations ne sont donc pas biaisées par la fréquence de cellules infectées dans nos échantillons. L'absence de significativité entre Tat-Rev et les autres types de transcrits dans la condition

stimulée est probablement causée par les fortes variations interindividuelles observées pour ce transcrit. Des délétions internes ainsi que des hypermutations introduites par APOBEC dans la majorité des provirus pourraient expliquer des niveaux de détection plus bas pour certaines régions d'ARN, par exemple Tat-Rev (Ho et al. 2013) (Bruner et al. 2016). Bien que les régions *LTR* contiennent beaucoup de régions conservées (Strong et al. 2015), certains travaux ont montré qu'elles n'étaient pas sans altérations génétiques, ce qui pourrait expliquer des valeurs très basses de R dans certains échantillons (Shah et al. 2014) (O'Neil et al. 2002). L'activation des lymphocytes T CD4⁺ par la PMA et la ionomycine entraîne une augmentation de plusieurs facteurs de transcription cruciaux pour une transcription efficace du VIH via la protéine kinase C ou RasGRP (Puente, Stone, and Ostergaard 2000) (Ebinu et al. 2000) ainsi que par l'activation des voies calciques (Cantrell 1996). Cela concerne entre autres, les facteurs se liants aux régions promotrice du 5'-*LTR* comme NF-κB, NFAT et AP-1 (Albrecht et al. 2002), qui sont séquestrés dans le cytoplasme des lymphocytes T CD4⁺ au repos (Van Lint, Bouchat, and Marcello 2013), et qui migrent dans le noyau lors de l'activation. À la suite de l'activation, une augmentation de la production et de la disponibilité de P-TEFb va également induire une augmentation de la formation de complexe Tat/P-TEFb et favoriser l'élongation des transcrits du VIH (Ramakrishnan et al. 2012), puis par la suite leur complétion (maturation, épissage). Il n'est donc pas étonnant de constater une augmentation générale de la transcription, mais surtout une augmentation préférentielle pour l'élongation, la maturation ainsi que le polyépissage des transcrits lors de l'activation.

4.4 Corrélation des mesures d'ARN avec différentes techniques de mesure de réservoir du VIH

Nous avons établi des corrélations entre nos mesures de transcrits et différentes méthodes de mesures des réservoirs du VIH. Nous avons choisi les mesures de réservoirs par ADN intégré, la mesure de réservoir compétent à la traduction (HIV-Flow) ainsi que la mesure de réservoir infectieux (Q-VOA) pour différentes raisons discuté dans cette section. Nous avons observé une association positive entre les quantités d'ARN Pol mesurées et la taille du réservoir mesuré par ADN intégré dans les cellules non stimulées ($R^2 = 0,56$, $p = 0,038$), mais nous n'avons pas observé de corrélations significatives pour les autres transcrits, bien qu'une tendance pour les transcrits de type R ait été notée (Figure 20). Nous avons donc identifié un marqueur ARN (Pol) corrélant avec la taille du réservoir. Ce marqueur pourrait ainsi servir de mesure pour évaluer la taille du réservoir latent capable de produire des ARN longs. Il est bien établi que les mesures de réservoirs ciblant l'ADN proviral surestiment la taille du réservoir compétent pour la réplication (Rouzioux and Richman 2013) car une grande proportion de provirus sont mutés, ou contiennent des délétions (Bruner et al. 2016), et rien n'assure leur capacité à produire des ARN. Les mesures d'ARN Pol pourraient donc offrir une meilleure estimation de la taille du réservoir compétent à la réplication. Cependant, cette mesure inclut elle aussi une grande partie de génome VIH défectif, incapable de produire des protéines ou des virus infectieux malgré la production d'ARN long, et n'est donc pas un substitut optimal pour mesurer les réservoirs infectieux. En revanche, une étude a montrée que plus la quantité d'ARN VIH cellulaire (LTR-Gag) est élevée avant l'interruption de traitement, plus le temps pour atteindre le rebond viral est court (Li et al. 2016). Il est donc possible que la mesure d'ARN Pol associée aux cellules soit une bonne mesure de prédiction concernant le temps de

rebond viral lors d'une potentielle interruption de traitement. Une technique développée dans notre laboratoire (HIV-Flow) mesure la fréquence de lymphocytes T CD4⁺ exprimant la protéine de capsid p24. Cette technique présente l'avantage de donner une mesure de réservoir compétent à la traduction, et ainsi se rapprocher de la taille du réservoir capable de produire des particules virales infectieuses (données non publiées). La corrélation positive observée entre nos mesures d'ARN Tat-Rev dans les lymphocytes T CD4⁺ stimulés et la technique mentionnée ci-dessus ($R^2 = 0,57$, $p = 0,035$) suggère que cet ARN est un bon candidat pour évaluer la taille du réservoir inductible compétent pour la traduction (Figure 21). Le marqueur Tat-Rev n'est pas nouveau, puisqu'une technique de dilution limite (TILDA = *Tat-Rev Induced Limiting Dilution Assay*) permet de calculer la fréquence de cellules exprimant l'ARN après stimulation, et ainsi de mesurer la taille du réservoir inductible (Procopio et al. 2015). Nous n'avons observé aucune corrélation entre nos mesures des différents ARN et le Q-VOA. Ceci peut-être dû à l'imprécision du Q-VOA et au fait que la technique mesure uniquement les unités infectieuses virales produites par cycles de réplication (Siliciano and Siliciano 2005), comparativement à notre technique qui inclut la totalité des événements de transcription. Comme expliqué précédemment, il n'est pas garanti que ces transcrits produisent des protéines virales et encore moins des particules virales infectieuses.

4.5 Modulation du profil transcriptionnel du VIH avec différents agents anti-latence

Une des approches pour tenter de diminuer la taille du réservoir latent est de le réactiver pour permettre la détection d'épitoques viraux par le système immunitaire (entre autres par les lymphocytes T cytotoxiques), en utilisant par exemple différents composés

pharmacologiques, exerçant différents effets sur la cellule cible. Cette approche est nommée le « shock and kill » et a été l'objet de nombreuses études dans la mise au point d'un traitement ayant le potentiel d'éradiquer les réservoirs viraux (Ho and Siliciano 2015) (Xu et al. 2017). Nous avons mesuré la modulation du profil transcriptionnel au sein de lymphocytes T CD4⁺ en réponse à différentes classes d'agents anti-latence, soit des inhibiteurs d'histones déacétylases (HDACi), des inhibiteurs de bromodomaine (Bri), ainsi que des agonistes activateurs de la voie PKC (Figure 22). À dose EC50 (déterminée par des études pharmacologiques faites dans notre laboratoire), les HDACi (panobinostat et romidepsine) ainsi que l'inhibiteur de bromodomaine JQ-1 semblent être les moins efficaces dans l'induction de la transcription pour tous les types de transcrits mesurés, un résultat également rapporté par (Yukl et al. 2018). La romidepsine est plus efficace que le panobinostat dans l'induction des différents transcrits, et particulièrement Tat-Rev. Des études ont montré une efficacité accrue de la romidepsine et de JQ-1 dans la réactivation de la transcription comparativement au panobinostat (Shang et al. 2015). La nette augmentation dans l'induction de la transcription avec les agonistes de PKC peut être expliquée par l'augmentation de la phosphorylation et de l'inactivation de IκB, permettant ainsi NF-κB d'activer la transcription du VIH en se liant au LTR (Jiang and Dandekar 2015). L'augmentation plus forte des transcrits Pol, Poly-A et Tat-Rev avec ces composés indique que les agonistes de PKC ont potentiellement une influence sur des facteurs cruciaux dans la génération de ce type de transcrits (Figure 22). En effet, la PKC est capable de phosphoryler une sérine sur la protéine inhibitrice de P-TEFb, HEXIM1. La phosphorylation de celle-ci libère le complexe P-TEFb et permet une élongation de la transcription du VIH accrue (Fujinaga et al. 2012). Ainsi la double action des agonistes de PKC sur P-TEFb et NF-κB induit non seulement l'initiation de

la transcription, mais augmente également les processus d'élongation, de maturation et de polyépissage des transcrits. Malgré l'utilisation d'une dose à effet maximal (Figure 23) de panobinostat (100nM), soit 10 fois supérieure aux doses cliniquement utilisées (Wei et al. 2014), une faible induction de la transcription est observée comparativement aux autres conditions. Nous avons observé, comme dans des études publiées (Budhiraja and Rice 2013), une synergie dans l'induction de la transcription en utilisant le panobinostat (HDACi) et l'ingénol (agoniste de PKC), ainsi que la combinaison utilisant le panobinostat, l'ingénol et le JQ-1 (inhibiteur de bromodomaine). Il semble en revanche qu'il n'y ait pas de différence entre ces deux conditions, ce qui pourrait s'expliquer par une redondance dans l'activité de certains de ces composés. La molécule JQ-1 a la capacité de lier une protéine liant P-TEFb, BRD4. La liaison entre BRD4 et P-TEFb diminue la fréquence de liaison entre Tat et P-TEFb et bloque leur association, qui est nécessaire à l'élongation de la transcription du VIH. JQ-1 permet donc de diminuer la proportion de protéines BRD4 liées à P-TEFb, et favorise l'élongation des transcrits (Zhu et al. 2012). Comme nous l'avons décrit précédemment, les agonistes de PKC ont une propriété permettant entre autres la phosphorylation d'une protéine inhibitrice liée à P-TEFb et augmentent ainsi sa disponibilité en dissociant ce complexe (Fujinaga et al. 2015). Il sera important d'augmenter le nombre d'échantillons testés pour valider statistiquement ces résultats préliminaires.

L'expérience utilisant des hautes concentrations de différents agents pharmacologiques est descriptive, et avait pour but d'évaluer la labilité du profil transcriptionnel à des doses ayant potentiellement un effet maximal. D'un point de vue thérapeutique, la réactivation transcriptionnelle n'implique pas nécessairement une production efficace de protéines virales, ou de particules infectieuses. Le « Shock and Kill » repose sur l'exposition d'antigènes viraux

au système immunitaire ainsi que sur l'effet cytopathique de la production virale (Kim, Anderson, and Lewin 2018) pour l'élimination des réservoirs viraux. Des essais cliniques ont montré que, malgré une réactivation transcriptionnelle (menant parfois à une augmentation de la production virale *in vivo*), ces traitements ne diminuent pas la taille du réservoir (Rasmussen et al. 2014) (Delagreverie et al. 2016) (Sogaard et al. 2015) (Gutierrez et al. 2016). De plus, il existe encore plusieurs aspects problématiques dans l'utilisation de certains agents pharmacologique, comme leur toxicité (Clutton et al. 2016) ou encore leur capacité à diminuer l'efficacité des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxique à éliminer des cellules cibles (Jones et al. 2014) (Spivak and Planelles 2018).

4.6 Profil transcriptionnel du VIH au sein de sous-population de lymphocytes T CD4⁺ mémoires

Les lymphocytes T_{CM} et T_{TM} sont connus pour leur longue demi-vie, favorisant ainsi la persistance du VIH au sein de ces sous-populations au cours des thérapies antirétrovirales. Par ailleurs, ces sous-populations sont retrouvées à une plus grande fréquence que les T_{EM} (Lee and Lichterfeld 2016), et il n'est donc pas surprenant qu'elles soient donc considérées comme majoritairement responsable de la persistance virale (Chomont et al. 2009). Une étude récente a observé que les cellules effectrices récemment activées en transition vers les T_{CM} quiescentes étaient les plus permissives à l'infection latente par le VIH de tropisme CCR5 (Shan et al. 2017), qui est majoritaire au sein du réservoir latent et inductible (Zerbato et al. 2016). Nous avons observé des niveaux d'ADN intégrés plus élevés dans les sous-populations T CD4⁺ mémoires comparativement aux lymphocytes T CD4⁺ naïfs (Figure 24-B), comme décrits dans

la littérature (Jaafoura et al. 2014) (Dai et al. 2009). Il est possible que la fusion entre les particules virales et les lymphocytes T CD4⁺ naïfs soit moins efficace dû à leur faible expression de CCR5, ou encore que les niveaux de transcription inverse soient restreints dans les cellules naïves (Dai et al. 2009) à cause du facteur de restriction SAMHD1 (Descours et al. 2012). Par contre, n'avons pas observé de différences significatives dans les différents transcrits entre les sous-populations T_{CM}, T_{TM} et T_{EM} (Figure 24-A). Étant donné la permissivité à l'infection accrue des T_{EM} comparativement aux autres sous-populations, une plus grande quantité d'ARN y était attendue pour un nombre de cellules données. Les quantités supérieures de la plupart des transcrits dans sous-populations mémoires comparativement aux lymphocytes naïfs sont probablement une conséquence directe des différences dans les niveaux d'infection. En effet, lorsque nous avons normalisé les quantités de transcrits mesurées dans les différentes populations de lymphocytes T CD4⁺ par unité provirale, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les sous-populations mémoires et les lymphocytes naïfs (Figure 25). Cette absence de différence signifie que chaque provirus produit des quantités relativement similaires des différents transcrits, mais n'implique pas nécessairement que le potentiel de transcription basal est identique au sein des différentes populations. Les différences observées concernant le facteur de transcription NF-κB lors du passage de T effectrices au T_{CM} (Shan et al. 2017) pourrait être retrouvées entre les T_{CM} et les T_{EM}. Par exemple, lorsqu'une T_{CM} se différencie en T_{EM} (Figure 7), il est possible que son niveau d'activation augmente, et pourrait potentiellement provoquer une augmentation de facteur de transcription NF-κB. Ceci pourrait en partie expliquer une différence de potentiel de transcription basale des T_{CM} par rapport au T_{EM}. Étant donné que nous n'avons pas observé de différences au niveau transcriptionnel entre ces sous-populations

mémoires, cela laisse penser que la disponibilité accrue de certains facteurs de transcription dans les T_{EM} comparativement aux autres populations n'est probablement pas le facteur limitant dans le processus de transcription. Par ailleurs, de bas niveaux de P-TEFb ont été observés dans les lymphocytes T $CD4^+$ naïfs ainsi que dans un modèle de T_{CM} (Budhiraja et al. 2013). Il est également possible qu'une concentration accrue de P-TEFb soit présente au sein des T_{EM} . Une étude récente a montré que lorsque réactivée par différents agents anti-latence, les T_N produisent des quantités similaires d'ARN de virions comparativement aux T_{CM} (Zerbato et al. 2016). Il est donc possible que malgré leur fréquence d'infection extrêmement faible, les T_N restent des cibles importantes à considérer dans les stratégies d'éradication du VIH. Nous nous attendions initialement à trouver de plus grands niveaux de transcription au sein de sous-types mémoires plus différenciés comme les T_{EM} , qui sont caractérisés par des niveaux d'activation supérieurs comparativement aux T_{CM} . Bien que la différenciation n'implique pas nécessairement une activation (certaines T_{EM} peuvent être quiescentes), une plus grande proportion du marqueur d'activation HLA-DR (Resino et al. 2001) est retrouvé au sein des sous-populations T_{EM} (donnée de notre laboratoire non présentée). En contrepartie, nous nous attendions à observer des niveaux de transcription plus faibles au sein des sous-populations T_{CM} et T_{TM} . Contrairement à notre hypothèse, nous avons observé des profils transcriptionnels similaires dans toutes les sous-populations de lymphocytes T $CD4^+$ mémoires (Figure 26). De manière similaire au profil transcriptionnel retrouvé dans les $CD4^+$ totaux, il semble y avoir une diminution dans l'élongation, la maturation ainsi que le polyépissage de transcrits du VIH dans toutes les sous-populations mémoires. Il est possible qu'il n'y ait pas suffisamment de différences biologiquement significatives dans les facteurs régulant la latence entre ces différentes sous-populations pour

induire une différence marquée dans le profil transcriptionnel à l'état latent. En revanche, nous n'avons pas encore étudié l'impact des AAL sur le profil transcriptionnel au sein des différentes sous-populations. Il se peut que des profils transcriptionnels différents émergent au sein des sous-populations, reflétant des capacités de réactivation transcriptionnelle différentes. L'absence de différences significatives entre les différents transcrits au sein des CD4⁺ naïves est potentiellement liée aux basses quantités d'ARN mesurées, proches de la limite de détection. Cette limitation est difficile à surmonter en raison des très bas niveaux d'infection latente au sein de cette population. Il est donc difficile d'interpréter ces résultats et il est important de souligner le fait qu'ils restent préliminaires et que l'analyse d'échantillons supplémentaires sera nécessaire pour les confirmer ou les infirmer.

4.7 Perspectives et futures expériences

Nous avons analysé le profil transcriptionnel à l'état latent au sein de lymphocytes T CD4⁺ totaux, ainsi que dans les différentes sous-populations mémoires et après 18-24h de stimulation en utilisant une panoplie de différentes techniques de réactivation. Bien que ces résultats permettent d'apprécier la nature et les proportions des différents transcrits mesurés, certaines limitations dans l'interprétation de résultats sont importantes à mentionner. Premièrement, pour déterminer si les résultats observés sont dus à des blocages dans certaines étapes de la transcription, il sera important de faire une étude de cinétique du profil transcriptionnel avec et sans stimulation. La transcription est un processus rapide et labile, il est donc hâtif de conclure que nos observations s'expliquent par un blocage dans certaines étapes de la transcription. Il serait donc intéressant de répéter ces expériences à différents

temps (par exemple : 2h, 6h, 12h, 18h, 24h) afin d'analyser la modulation du profil transcriptionnel à travers le temps. Peut-être serait-il aussi judicieux de comparer ces résultats au sein d'individus infectés et traités par thérapie antirétrovirale avec ceux d'individus non traités, pour ainsi avoir une idée de la variation du profil dans ces deux situations cliniques. Finalement, bien qu'il soit justifiable d'étudier les variations du profil transcriptionnel en fonction des agents anti-latence utilisés, cet angle d'analyse ne donne pas d'information sur la production de particules virales. Il sera donc important, particulièrement dans le contexte du « Shock and Kill », d'étudier l'impact de la modulation de profil transcriptionnel avec différents AAL sur la production de virions. Cela pourrait ainsi permettre d'identifier les étapes de la transcription cruciales pour permettre de produire de nouvelles particules virales et ainsi potentiellement permettre au système immunitaire de les cibler.

Chapitre 5 : Conclusion

Nous avons mis au point un protocole sensible et robuste de RT-PCR nous permettant d'établir le profil transcriptionnel des lymphocytes T CD4⁺ totaux ainsi que les sous-populations de T CD4⁺ mémoires. L'utilisation de standards ARN nous permet de mesurer des quantités absolues des différents transcrits et contrôle pour la qualité dans l'étape de transcription inverse. Bien qu'une partie de nos résultats reste préliminaires, nos observations sont souvent en accord avec la littérature récente. À l'état latent, il semble que les transcrits reflétant l'élongation distale, la maturation, ainsi que le polyépissage soient en moindre proportion comparativement aux événements d'élongations proximales dans les lymphocytes T CD4⁺ totaux, ainsi que dans les sous-populations de cellules mémoires. Nos résultats pourraient être expliqués par un ou plusieurs blocages dans le processus de transcription en aval de l'initiation de l'élongation. D'autre part, nous avons identifié des combinaisons de plusieurs agents anti-latence, capables d'induire une induction préférentielle dans l'élongation, la maturation et le polyépissage des transcrits. La mise au point de notre technique nous a permis d'infirmer notre hypothèse initiale qui stipulait que différents profils transcriptionnels étaient présents au sein des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires. Une augmentation du nombre d'échantillons analysés pour plusieurs de nos expériences sera importante pour permettre des analyses statistiques plus robustes. Néanmoins, la mise au point de cette technique va fournir à notre laboratoire un nouvel outil permettant de répondre à des questions importantes, telles que l'impact de différents AAL sur la transcription dans différents tissus, ou encore dans des sous-populations cellulaires d'intérêt. Pour terminer, ce travail pourrait contribuer à déterminer l'efficacité des thérapies comme le « Shock and Kill »

et potentiellement avoir un impact prédictif sur le succès ou non de certaines techniques de réactivation du VIH hors de sa latence.

Bibliographie

- Adams, M., L. Sharmeen, J. Kimpton, J. M. Romeo, J. V. Garcia, B. M. Peterlin, M. Groudine, and M. Emerman. 1994. 'Cellular latency in human immunodeficiency virus-infected individuals with high CD4 levels can be detected by the presence of promoter-proximal transcripts', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 3862-6.
- Albrecht, B., C. D. D'Souza, W. Ding, S. Tridandapani, K. M. Coggeshall, and M. D. Lairmore. 2002. 'Activation of nuclear factor of activated T cells by human T-lymphotropic virus type 1 accessory protein p12(I)', *J Virol*, 76: 3493-501.
- Anthony, K. B., C. Yoder, J. A. Metcalf, R. DerSimonian, J. M. Orenstein, R. A. Stevens, J. Falloon, M. A. Polis, H. C. Lane, and I. Sereti. 2003. 'Incomplete CD4 T cell recovery in HIV-1 infection after 12 months of highly active antiretroviral therapy is associated with ongoing increased CD4 T cell activation and turnover', *J Acquir Immune Defic Syndr*, 33: 125-33.
- Arts, E. J., and D. J. Hazuda. 2012. 'HIV-1 antiretroviral drug therapy', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a007161.
- Asamitsu, K., and T. Okamoto. 2017. 'The Tat/P-TEFb Protein-Protein Interaction Determining Transcriptional Activation of HIV', *Curr Pharm Des*, 23: 4091-97.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. 'Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)', *Science*, 220: 868-71.
- Barton, K., A. Winckelmann, and S. Palmer. 2016. 'HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy', *Trends Microbiol*, 24: 345-55.
- Bruner, K. M., A. J. Murray, R. A. Pollack, M. G. Soliman, S. B. Laskey, A. A. Capoferri, J. Lai, M. C. Strain, S. M. Lada, R. Hoh, Y. C. Ho, D. D. Richman, S. G. Deeks, J. D. Siliciano, and R. F. Siliciano. 2016. 'Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection', *Nat Med*, 22: 1043-9.

- Budhiraja, S., M. Famiglietti, A. Bosque, V. Planelles, and A. P. Rice. 2013. 'Cyclin T1 and CDK9 T-loop phosphorylation are downregulated during establishment of HIV-1 latency in primary resting memory CD4+ T cells', *J Virol*, 87: 1211-20.
- Budhiraja, S., and A. P. Rice. 2013. 'Reactivation of latent HIV: do all roads go through P-TEFb?', *Future Virol*, 8.
- Bullen, C. K., G. M. Laird, C. M. Durand, J. D. Siliciano, and R. F. Siliciano. 2014. 'New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo', *Nat Med*, 20: 425-9.
- Cantrell, D. 1996. 'T cell antigen receptor signal transduction pathways', *Annu Rev Immunol*, 14: 259-74.
- Centers for Disease, Control. 1982a. 'Persistent, generalized lymphadenopathy among homosexual males', *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 31: 249-51.
- . 1982b. 'Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States', *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 31: 507-8, 13-4.
- Chavez, L., V. Calvanese, and E. Verdin. 2015. 'HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T Cells', *PLoS Pathog*, 11: e1004955.
- Chomont, N., M. El-Far, P. Ancuta, L. Trautmann, F. A. Procopio, B. Yassine-Diab, G. Boucher, M. R. Boulassel, G. Ghattas, J. M. Brenchley, T. W. Schacker, B. J. Hill, D. C. Douek, J. P. Routy, E. K. Haddad, and R. P. Sekaly. 2009. 'HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation', *Nat Med*, 15: 893-900.
- Churchill, M. J., S. G. Deeks, D. M. Margolis, R. F. Siliciano, and R. Swanstrom. 2016. 'HIV reservoirs: what, where and how to target them', *Nat Rev Microbiol*, 14: 55-60.
- Clutton, G., Y. Xu, P. L. Baldoni, K. R. Mollan, J. Kirchherr, W. Newhard, K. Cox, J. D. Kuruc, A. Kashuba, R. Barnard, N. Archin, C. L. Gay, M. G. Hudgens, D. M. Margolis, and N. Goonetilleke. 2016. 'The differential short- and long-term effects of HIV-1 latency-reversing agents on T cell function', *Sci Rep*, 6: 30749.
- Craigie, R., and F. D. Bushman. 2012. 'HIV DNA integration', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a006890.

- Cure, S. G. Deeks, B. Autran, B. Berkhout, M. Benkirane, S. Cairns, N. Chomont, T. W. Chun, M. Churchill, M. Di Mascio, C. Katlama, A. Lafeuillade, A. Landay, M. Lederman, S. R. Lewin, F. Maldarelli, D. Margolis, M. Markowitz, J. Martinez-Picado, J. I. Mullins, J. Mellors, S. Moreno, U. O'Doherty, S. Palmer, M. C. Penicaud, M. Peterlin, G. Poli, J. P. Routy, C. Rouzioux, G. Silvestri, M. Stevenson, A. Telenti, C. Van Lint, E. Verdin, A. Woolfrey, J. Zaia, and F. Barre-Sinoussi. 2012. 'Towards an HIV cure: a global scientific strategy', *Nat Rev Immunol*, 12: 607-14.
- D'Orso, I., G. M. Jang, A. W. Pastuszak, T. B. Faust, E. Quezada, D. S. Booth, and A. D. Frankel. 2012. 'Transition step during assembly of HIV Tat:P-TEFb transcription complexes and transfer to TAR RNA', *Mol Cell Biol*, 32: 4780-93.
- Dai, J., L. M. Agosto, C. Baytop, J. J. Yu, M. J. Pace, M. K. Liszewski, and U. O'Doherty. 2009. 'Human immunodeficiency virus integrates directly into naive resting CD4⁺ T cells but enters naive cells less efficiently than memory cells', *J Virol*, 83: 4528-37.
- Damouche, A., T. Lazure, V. Avettand-Fenoel, N. Huot, N. Dejucq-Rainsford, A. P. Satie, A. Melard, L. David, C. Gomet, J. Ghosn, N. Noel, G. Pourcher, V. Martinez, S. Benoist, V. Bereziat, A. Cosma, B. Favier, B. Vaslin, C. Rouzioux, J. Capeau, M. Muller-Trutwin, N. Dereuddre-Bosquet, R. Le Grand, O. Lambotte, and C. Bourgeois. 2015. 'Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection', *PLoS Pathog*, 11: e1005153.
- Datta, P. K., R. Kaminski, W. Hu, V. Pirrone, N. T. Sullivan, M. R. Nonnemacher, W. Dampier, B. Wigdahl, and K. Khalili. 2016. 'HIV-1 Latency and Eradication: Past, Present and Future', *Curr HIV Res*, 14: 431-41.
- Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G. A. Huttley, M. W. Smith, R. Allikmets, J. J. Goedert, S. P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. Gomperts, S. Donfield, D. Vlahov, R. Kaslow, A. Saah, C. Rinaldo, R. Detels, and S. J. O'Brien. 1996. 'Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study', *Science*, 273: 1856-62.
- Deeks, S. G. 2012. 'HIV: Shock and kill', *Nature*, 487: 439-40.

- Delagreverie, H. M., C. Delaugerre, S. R. Lewin, S. G. Deeks, and J. Z. Li. 2016. 'Ongoing Clinical Trials of Human Immunodeficiency Virus Latency-Reversing and Immunomodulatory Agents', *Open Forum Infect Dis*, 3: ofw189.
- Deleage, C., M. Moreau, N. Rioux-Leclercq, A. Ruffault, B. Jegou, and N. Dejucq-Rainsford. 2011. 'Human immunodeficiency virus infects human seminal vesicles in vitro and in vivo', *Am J Pathol*, 179: 2397-408.
- Descours, B., A. Cribier, C. Chable-Bessia, D. Ayinde, G. Rice, Y. Crow, A. Yatim, O. Schwartz, N. Laguet, and M. Benkirane. 2012. 'SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells', *Retrovirology*, 9: 87.
- Devonshire, A. S., R. Elaswarapu, and C. A. Foy. 2011. 'Applicability of RNA standards for evaluating RT-qPCR assays and platforms', *BMC Genomics*, 12: 118.
- Diaz, L., M. Martinez-Bonet, J. Sanchez, A. Fernandez-Pineda, J. L. Jimenez, E. Munoz, S. Moreno, S. Alvarez, and M. A. Munoz-Fernandez. 2015. 'Bryostatins activate HIV-1 latent expression in human astrocytes through a PKC and NF- κ B-dependent mechanism', *Sci Rep*, 5: 12442.
- Ebinu, J. O., S. L. Stang, C. Teixeira, D. A. Bottorff, J. Hooton, P. M. Blumberg, M. Barry, R. C. Bleakley, H. L. Ostergaard, and J. C. Stone. 2000. 'RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras', *Blood*, 95: 3199-203.
- Fernandes, J., B. Jayaraman, and A. Frankel. 2012. 'The HIV-1 Rev response element: an RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homo-oligomeric ribonucleoprotein complex', *RNA Biol*, 9: 6-11.
- Finzi, D., M. Hermankova, T. Pierson, L. M. Carruth, C. Buck, R. E. Chaisson, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D. D. Ho, D. D. Richman, and R. F. Siliciano. 1997. 'Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy', *Science*, 278: 1295-300.
- Friedman-Kien, A. E. 1981. 'Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men', *J Am Acad Dermatol*, 5: 468-71.
- Fujinaga, K., M. Barboric, Q. Li, Z. Luo, D. H. Price, and B. M. Peterlin. 2012. 'PKC phosphorylates HEXIM1 and regulates P-TEFb activity', *Nucleic Acids Res*, 40: 9160-70.

- Fujinaga, K., Z. Luo, F. Schaufele, and B. M. Peterlin. 2015. 'Visualization of positive transcription elongation factor b (P-TEFb) activation in living cells', *J Biol Chem*, 290: 1829-36.
- Fun, A., H. P. Mok, M. R. Wills, and A. M. Lever. 2017. 'A highly reproducible quantitative viral outgrowth assay for the measurement of the replication-competent latent HIV-1 reservoir', *Sci Rep*, 7: 43231.
- Furtado, M. R., D. S. Callaway, J. P. Phair, K. J. Kunstman, J. L. Stanton, C. A. Macken, A. S. Perelson, and S. M. Wolinsky. 1999. 'Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy', *N Engl J Med*, 340: 1614-22.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, and M. Popovic. 1983. 'Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)', *Science*, 220: 865-7.
- Gilman, Sander L. 1987. 'AIDS and Syphilis: The Iconography of Disease', *October*, 43: 87-107.
- Giuliano, M., and S. Vella. 2007. 'Inequalities in health: access to treatment for HIV/AIDS', *Ann Ist Super Sanita*, 43: 313-6.
- Guhaniyogi, J., and G. Brewer. 2001. 'Regulation of mRNA stability in mammalian cells', *Gene*, 265: 11-23.
- Gulzar, N., and K. F. Copeland. 2004. 'CD8+ T-cells: function and response to HIV infection', *Curr HIV Res*, 2: 23-37.
- Gutierrez, C., S. Serrano-Villar, N. Madrid-Elena, M. J. Perez-Elias, M. E. Martin, C. Barbas, J. Ruiperez, E. Munoz, M. A. Munoz-Fernandez, T. Castor, and S. Moreno. 2016. 'Bryostatin-1 for latent virus reactivation in HIV-infected patients on antiretroviral therapy', *Aids*, 30: 1385-92.
- Haff, L. A. 1994. 'Improved quantitative PCR using nested primers', *PCR Methods Appl*, 3: 332-7.
- Henrich, T. J., H. Hatano, O. Bacon, L. E. Hogan, R. Rutishauser, A. Hill, M. F. Kearney, E. M. Anderson, S. P. Buchbinder, S. E. Cohen, M. Abdel-Mohsen, C. W. Pohlmeier, R. Fromentin, R. Hoh, A. Y. Liu, J. M. McCune, J. Spindler, K. Metcalf-Pate, K. S.

- Hobbs, C. Thanh, E. A. Gibson, D. R. Kuritzkes, R. F. Siliciano, R. W. Price, D. D. Richman, N. Chomont, J. D. Siliciano, J. W. Mellors, S. A. Yukl, J. N. Blankson, T. Liegler, and S. G. Deeks. 2017. 'HIV-1 persistence following extremely early initiation of antiretroviral therapy (ART) during acute HIV-1 infection: An observational study', *PLoS Med*, 14: e1002417.
- Ho, Y. C., L. Shan, N. N. Hosmane, J. Wang, S. B. Laskey, D. I. Rosenbloom, J. Lai, J. N. Blankson, J. D. Siliciano, and R. F. Siliciano. 2013. 'Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure', *Cell*, 155: 540-51.
- Ho, Y. C., and J. D. Siliciano. 2015. 'Efforts to eliminate the latent reservoir in resting CD4+ T cells: strategies for curing HIV-1 infection', *J Virus Erad*, 1: 229-31.
- Hu, Y., and G. K. Smyth. 2009. 'ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays', *J Immunol Methods*, 347: 70-8.
- Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin, and A. Zumla. 2005. 'Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations', *Genes Immun*, 6: 279-84.
- Jaafoura, S., M. G. de Goer de Herve, E. A. Hernandez-Vargas, H. Hendel-Chavez, M. Abdoh, M. C. Mateo, R. Krzysiek, M. Merad, R. Seng, M. Tardieu, J. F. Delfraissy, C. Goujard, and Y. Taoufik. 2014. 'Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated CD4(+) memory T Cells', *Nat Commun*, 5: 5407.
- Jiang, G., and S. Dandekar. 2015. 'Targeting NF-kappaB signaling with protein kinase C agonists as an emerging strategy for combating HIV latency', *AIDS Res Hum Retroviruses*, 31: 4-12.
- Jones, R. B., R. O'Connor, S. Mueller, M. Foley, G. L. Szeto, D. Karel, M. Lichterfeld, C. Kovacs, M. A. Ostrowski, A. Trocha, D. J. Irvine, and B. D. Walker. 2014. 'Histone deacetylase inhibitors impair the elimination of HIV-infected cells by cytotoxic T-lymphocytes', *PLoS Pathog*, 10: e1004287.
- Kaiser, P., S. K. Joshi, P. Kim, P. Li, H. Liu, A. P. Rice, J. K. Wong, and S. A. Yukl. 2017. 'Assays for precise quantification of total (including short) and elongated HIV-1 transcripts', *J Virol Methods*, 242: 1-8.

- Kamori, D., and T. Ueno. 2017. 'HIV-1 Tat and Viral Latency: What We Can Learn from Naturally Occurring Sequence Variations', *Front Microbiol*, 8: 80.
- Kandathil, A. J., S. Sugawara, and A. Balagopal. 2016. 'Are T cells the only HIV-1 reservoir?', *Retrovirology*, 13: 86.
- Kao, S. Y., A. F. Calman, P. A. Luciw, and B. M. Peterlin. 1987. 'Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product', *Nature*, 330: 489-93.
- Karn, J. 2011. 'The molecular biology of HIV latency: breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit', *Curr Opin HIV AIDS*, 6: 4-11.
- Karn, J., and C. M. Stoltzfus. 2012. 'Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a006916.
- Kim, Y., J. L. Anderson, and S. R. Lewin. 2018. 'Getting the "Kill" into "Shock and Kill": Strategies to Eliminate Latent HIV', *Cell Host Microbe*, 23: 14-26.
- Kong, L., and Q. J. Sattentau. 2012. 'Antigenicity and Immunogenicity in HIV-1 Antibody-Based Vaccine Design', *J AIDS Clin Res*, S8: 3.
- Kulpa, D. A., and N. Chomont. 2015. 'HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide?', *J Virus Erad*, 1: 59-66.
- Kwon, K. J., and R. F. Siliciano. 2017. 'HIV persistence: clonal expansion of cells in the latent reservoir', *J Clin Invest*, 127: 2536-38.
- Laird, G. M., D. I. Rosenbloom, J. Lai, R. F. Siliciano, and J. D. Siliciano. 2016. 'Measuring the Frequency of Latent HIV-1 in Resting CD4(+) T Cells Using a Limiting Dilution Coculture Assay', *Methods Mol Biol*, 1354: 239-53.
- Lee, G. Q., and M. Lichterfeld. 2016. 'Diversity of HIV-1 reservoirs in CD4+ T-cell subpopulations', *Curr Opin HIV AIDS*, 11: 383-7.
- Lenasi, T., X. Contreras, and B. M. Peterlin. 2008. 'Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency', *Cell Host Microbe*, 4: 123-33.
- Levy, J. A. 1993. 'HIV and host immune responses in AIDS pathogenesis', *J Clin Apher*, 8: 19-28.
- Li, G., S. Piampongsant, N. R. Faria, A. Voet, A. C. Pineda-Pena, R. Khouri, P. Lemey, A. M. Vandamme, and K. Theys. 2015. 'An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective', *Retrovirology*, 12: 18.

- Li, J. Z., B. Etemad, H. Ahmed, E. Aga, R. J. Bosch, J. W. Mellors, D. R. Kuritzkes, M. M. Lederman, M. Para, and R. T. Gandhi. 2016. 'The size of the expressed HIV reservoir predicts timing of viral rebound after treatment interruption', *Aids*, 30: 343-53.
- Li, Z., J. Guo, Y. Wu, and Q. Zhou. 2013. 'The BET bromodomain inhibitor JQ1 activates HIV latency through antagonizing Brd4 inhibition of Tat-transactivation', *Nucleic Acids Res*, 41: 277-87.
- Loewenson, R., and D. McCoy. 2004. 'Access to antiretroviral treatment in Africa', *BMJ*, 328: 241-2.
- Mahiet, C., and C. M. Swanson. 2016. 'Control of HIV-1 gene expression by SR proteins', *Biochem Soc Trans*, 44: 1417-25.
- Manson McManamy, M. E., S. Hakre, E. M. Verdin, and D. M. Margolis. 2014. 'Therapy for latent HIV-1 infection: the role of histone deacetylase inhibitors', *Antivir Chem Chemother*, 23: 145-9.
- Marban, C., F. Forouzanfar, A. Ait-Ammar, F. Fahmi, H. El Mekdad, F. Daouad, O. Rohr, and C. Schwartz. 2016. 'Targeting the Brain Reservoirs: Toward an HIV Cure', *Front Immunol*, 7: 397.
- Margolis, D. M. 2010. 'Mechanisms of HIV latency: an emerging picture of complexity', *Curr HIV/AIDS Rep*, 7: 37-43.
- Mbonye, U., and J. Karn. 2014. 'Transcriptional control of HIV latency: cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure', *Virology*, 454-455: 328-39.
- McDonald, David, Marie A. Vodicka, Ginger Lucero, Tatyana M. Svitkina, Gary G. Borisy, Michael Emerman, and Thomas J. Hope. 2002. 'Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells', *The Journal of Cell Biology*, 159: 441-52.
- Meintjes, G., M. A. Moorhouse, S. Carmona, N. Davies, S. Dlamini, C. van Vuuren, T. Manzini, M. Mathe, Y. Moosa, J. Nash, J. Nel, Y. Pakade, J. Woods, G. Van Zyl, F. Conradie, and F. Venter. 2017. 'Adult antiretroviral therapy guidelines 2017', *South Afr J HIV Med*, 18: 776.
- Michels, A. A., A. Fraldi, Q. Li, T. E. Adamson, F. Bonnet, V. T. Nguyen, S. C. Sedore, J. P. Price, D. H. Price, L. Lania, and O. Bensaude. 2004. 'Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor', *Embo j*, 23: 2608-19.

- Mitsuya, H., K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St Clair, S. N. Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, and S. Broder. 1985. '3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 7096-100.
- Natarajan, M., G. M. Schiralli Lester, C. Lee, A. Missra, G. A. Wasserman, M. Steffen, D. S. Gilmour, and A. J. Henderson. 2013. 'Negative elongation factor (NELF) coordinates RNA polymerase II pausing, premature termination, and chromatin remodeling to regulate HIV transcription', *J Biol Chem*, 288: 25995-6003.
- Nguyen, V. T., T. Kiss, A. A. Michels, and O. Bensaude. 2001. '7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes', *Nature*, 414: 322-5.
- O'Neil, P. K., G. Sun, H. Yu, Y. Ron, J. P. Dougherty, and B. D. Preston. 2002. 'Mutational analysis of HIV-1 long terminal repeats to explore the relative contribution of reverse transcriptase and RNA polymerase II to viral mutagenesis', *J Biol Chem*, 277: 38053-61.
- Olivieri, E. H., A. Franco Lde, R. G. Pereira, L. D. Mota, A. H. Campos, and D. M. Carraro. 2014. 'Biobanking practice: RNA storage at low concentration affects integrity', *Biopreserv Biobank*, 12: 46-52.
- Pasquau, J., C. Hidalgo-Tenorio, M. L. Montes, A. Romero-Palacios, J. Vergas, I. Sanjoaquin, J. Hernandez-Quero, K. Aguirrebengoa, F. Orihuela, A. Imaz, M. J. Rios-Villegas, J. Flores, M. C. Farinas, P. Vazquez, M. J. Galindo, I. Garcia-Merce, F. Lozano, I. de Los Santos, S. E. de Jesus, and C. Garcia-Vallecillos. 2018. 'High quality of life, treatment tolerability, safety and efficacy in HIV patients switching from triple therapy to lopinavir/ritonavir monotherapy: A randomized clinical trial', *PLoS One*, 13: e0195068.
- Pereira, L. A., K. Bentley, A. Peeters, M. J. Churchill, and N. J. Deacon. 2000. 'A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter', *Nucleic Acids Res*, 28: 663-8.
- Pierson, T., J. McArthur, and R. F. Siliciano. 2000. 'Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy', *Annu Rev Immunol*, 18: 665-708.

- Procopio, F. A., R. Fromentin, D. A. Kulpa, J. H. Brehm, A. G. Bebin, M. C. Strain, D. D. Richman, U. O'Doherty, S. Palmer, F. M. Hecht, R. Hoh, R. J. Barnard, M. D. Miller, D. J. Hazuda, S. G. Deeks, R. P. Sekaly, and N. Chomont. 2015. 'A Novel Assay to Measure the Magnitude of the Inducible Viral Reservoir in HIV-infected Individuals', *EBioMedicine*, 2: 874-83.
- Puente, L. G., J. C. Stone, and H. L. Ostergaard. 2000. 'Evidence for protein kinase C-dependent and -independent activation of mitogen-activated protein kinase in T cells: potential role of additional diacylglycerol binding proteins', *J Immunol*, 165: 6865-71.
- Ramakrishnan, R., K. Chiang, H. Liu, S. Budhiraja, H. Donahue, and A. P. Rice. 2012. 'Making a Short Story Long: Regulation of P-TEFb and HIV-1 Transcriptional Elongation in CD4+ T Lymphocytes and Macrophages', *Biology (Basel)*, 1: 94-115.
- Rasmussen, T. A., M. Tolstrup, C. R. Brinkmann, R. Olesen, C. Erikstrup, A. Solomon, A. Winckelmann, S. Palmer, C. Dinarello, M. Buzon, M. Lichterfeld, S. R. Lewin, L. Ostergaard, and O. S. Sogaard. 2014. 'Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial', *Lancet HIV*, 1: e13-21.
- Reid, M., Y. Ma, R. Scherzer, J. C. Price, A. L. French, G. D. Huhn, M. W. Plankey, M. Peters, C. Grunfeld, and P. C. Tien. 2018. 'Contribution of Liver Fibrosis and Microbial Translocation to Immune Activation in Persons Infected With HIV and/or Hepatitis C Virus', *J Infect Dis*, 217: 1289-97.
- Resino, S., J. Navarro, J. M. Bellon, D. Gurbindo, J. A. Leon, and M. A. Munoz-Fernandez. 2001. 'Naive and memory CD4+ T cells and T cell activation markers in HIV-1 infected children on HAART', *Clin Exp Immunol*, 125: 266-73.
- Rousseau, C. M., R. W. Nduati, B. A. Richardson, G. C. John-Stewart, D. A. Mbori-Ngacha, J. K. Kreiss, and J. Overbaugh. 2004. 'Association of levels of HIV-1-infected breast milk cells and risk of mother-to-child transmission', *J Infect Dis*, 190: 1880-8.
- Rouzioux, C., and D. Richman. 2013. 'How to best measure HIV reservoirs?', *Curr Opin HIV AIDS*, 8: 170-5.
- Saksena, N. K., B. Wang, L. Zhou, M. Soedjono, Y. S. Ho, and V. Conceicao. 2010. 'HIV reservoirs in vivo and new strategies for possible eradication of HIV from the reservoir sites', *HIV AIDS (Auckl)*, 2: 103-22.

- Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman. 2002. 'HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots', *Cell*, 110: 521-9.
- Seitz, Prof. Dr. Rainer. 2016. 'Human Immunodeficiency Virus (HIV)', *Transfus Med Hemother*, 43: 203-22.
- Shah, S., A. Alexaki, V. Pirrone, S. Dahiya, M. R. Nonnemacher, and B. Wigdahl. 2014. 'Functional properties of the HIV-1 long terminal repeat containing single-nucleotide polymorphisms in Sp site III and CCAAT/enhancer binding protein site I', *Virol J*, 11: 92.
- Shan, L., K. Deng, H. Gao, S. Xing, A. A. Capoferri, C. M. Durand, S. A. Rabi, G. M. Laird, M. Kim, N. N. Hosmane, H. C. Yang, H. Zhang, J. B. Margolick, L. Li, W. Cai, R. Ke, R. A. Flavell, J. D. Siliciano, and R. F. Siliciano. 2017. 'Transcriptional Reprogramming during Effector-to-Memory Transition Renders CD4(+) T Cells Permissive for Latent HIV-1 Infection', *Immunity*, 47: 766-75 e3.
- Shan, L., S. A. Rabi, G. M. Laird, E. E. Eisele, H. Zhang, J. B. Margolick, and R. F. Siliciano. 2013. 'A novel PCR assay for quantification of HIV-1 RNA', *J Virol*, 87: 6521-5.
- Shang, H. T., J. W. Ding, S. Y. Yu, T. Wu, Q. L. Zhang, and F. J. Liang. 2015. 'Progress and challenges in the use of latent HIV-1 reactivating agents', *Acta Pharmacol Sin*, 36: 908-16.
- Sharp, P. M., and B. H. Hahn. 2010. 'The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365: 2487-94.
- Siliciano, J. D., and R. F. Siliciano. 2005. 'Enhanced culture assay for detection and quantitation of latently infected, resting CD4⁺ T-cells carrying replication-competent virus in HIV-1-infected individuals', *Methods Mol Biol*, 304: 3-15.
- Simon, V., D. D. Ho, and Q. Abdool Karim. 2006. 'HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment', *Lancet*, 368: 489-504.
- Sodowich, B. I., I. Fadl, and C. Burns. 2007. 'Method validation of in vitro RNA transcript analysis on the Agilent 2100 Bioanalyzer', *Electrophoresis*, 28: 2368-78.
- Sogaard, O. S., M. E. Graversen, S. Leth, R. Olesen, C. R. Brinkmann, S. K. Nissen, A. S. Kjaer, M. H. Schleimann, P. W. Denton, W. J. Hey-Cunningham, K. K. Koelsch, G. Pantaleo, K. Krogsgaard, M. Sommerfelt, R. Fromentin, N. Chomont, T. A.

- Rasmussen, L. Ostergaard, and M. Tolstrup. 2015. 'The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo', *PLoS Pathog*, 11: e1005142.
- Spivak, A. M., and V. Planelles. 2018. 'Novel Latency Reversal Agents for HIV-1 Cure', *Annu Rev Med*, 69: 421-36.
- Strong, C. L., H. P. Guerra, K. R. Mathew, N. Roy, L. R. Simpson, and M. R. Schiller. 2015. 'Damaging the Integrated HIV Proviral DNA with TALENs', *PLoS One*, 10: e0125652.
- Sundquist, W. I., and H. G. Krausslich. 2012. 'HIV-1 assembly, budding, and maturation', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a006924.
- Thorlund, K., M. S. Horwitz, B. T. Fife, R. Lester, and D. W. Cameron. 2017. 'Landscape review of current HIV 'kick and kill' cure research - some kicking, not enough killing', *BMC Infect Dis*, 17: 595.
- Vaishnav, Yashwantra N., and Flossie Wong-Staal. 1991. 'The Biochemistry of AIDS', *Annual Review of Biochemistry*, 60: 577-630.
- Van Lint, C., S. Bouchat, and A. Marcello. 2013. 'HIV-1 transcription and latency: an update', *Retrovirology*, 10: 67.
- Van Zyl, G. U., M. G. Katusiime, A. Wiegand, W. R. McManus, M. J. Bale, E. K. Halvas, B. Luke, V. F. Boltz, J. Spindler, B. Laughton, S. Engelbrecht, J. M. Coffin, M. F. Cotton, W. Shao, J. W. Mellors, and M. F. Kearney. 2017. 'No evidence of HIV replication in children on antiretroviral therapy', *J Clin Invest*, 127: 3827-34.
- Verdin, E., P. Paras, Jr., and C. Van Lint. 1993. 'Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation', *Embo j*, 12: 3249-59.
- Wei, D. G., V. Chiang, E. Fyne, M. Balakrishnan, T. Barnes, M. Graupe, J. Hesselgesser, A. Irrinki, J. P. Murry, G. Stepan, K. M. Stray, A. Tsai, H. Yu, J. Spindler, M. Kearney, C. A. Spina, D. McMahon, J. Lalezari, D. Sloan, J. Mellors, R. Geleziunas, and T. Cihlar. 2014. 'Histone deacetylase inhibitor romidepsin induces HIV expression in CD4 T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy at concentrations achieved by clinical dosing', *PLoS Pathog*, 10: e1004071.
- Wilens, C. B., J. C. Tilton, and R. W. Doms. 2012. 'HIV: cell binding and entry', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.

- Williams, S. A., and W. C. Greene. 2007. 'Regulation of HIV-1 latency by T-cell activation', *Cytokine*, 39: 63-74.
- Xu, W., H. Li, Q. Wang, C. Hua, H. Zhang, W. Li, S. Jiang, and L. Lu. 2017. 'Advancements in Developing Strategies for Sterilizing and Functional HIV Cures', *Biomed Res Int*, 2017: 6096134.
- Yu, J. J., T. L. Wu, M. K. Liszewski, J. Dai, W. J. Swiggard, C. Baytop, I. Frank, B. L. Levine, W. Yang, T. Theodosopoulos, and U. O'Doherty. 2008. 'A more precise HIV integration assay designed to detect small differences finds lower levels of integrated DNA in HAART treated patients', *Virology*, 379: 78-86.
- Yuan, J. S., A. Reed, F. Chen, and C. N. Stewart, Jr. 2006. 'Statistical analysis of real-time PCR data', *BMC Bioinformatics*, 7: 85.
- Yukl, S. A., P. Kaiser, P. Kim, S. Telwatte, S. K. Joshi, M. Vu, H. Lampiris, and J. K. Wong. 2018. 'HIV latency in isolated patient CD4(+) T cells may be due to blocks in HIV transcriptional elongation, completion, and splicing', *Sci Transl Med*, 10.
- Zerbato, J. M., E. Serrao, G. Lenzi, B. Kim, Z. Ambrose, S. C. Watkins, A. N. Engelman, and N. Sluis-Cremer. 2016. 'Establishment and Reversal of HIV-1 Latency in Naive and Central Memory CD4+ T Cells In Vitro', *J Virol*, 90: 8059-73.
- Zhang, Z., A. Klatt, D. S. Gilmour, and A. J. Henderson. 2007. 'Negative elongation factor NELF represses human immunodeficiency virus transcription by pausing the RNA polymerase II complex', *J Biol Chem*, 282: 16981-8.
- Zhu, J., G. D. Gaiha, S. P. John, T. Pertel, C. R. Chin, G. Gao, H. Qu, B. D. Walker, S. J. Elledge, and A. L. Brass. 2012. 'Reactivation of latent HIV-1 by inhibition of BRD4', *Cell Rep*, 2: 807-16.

